

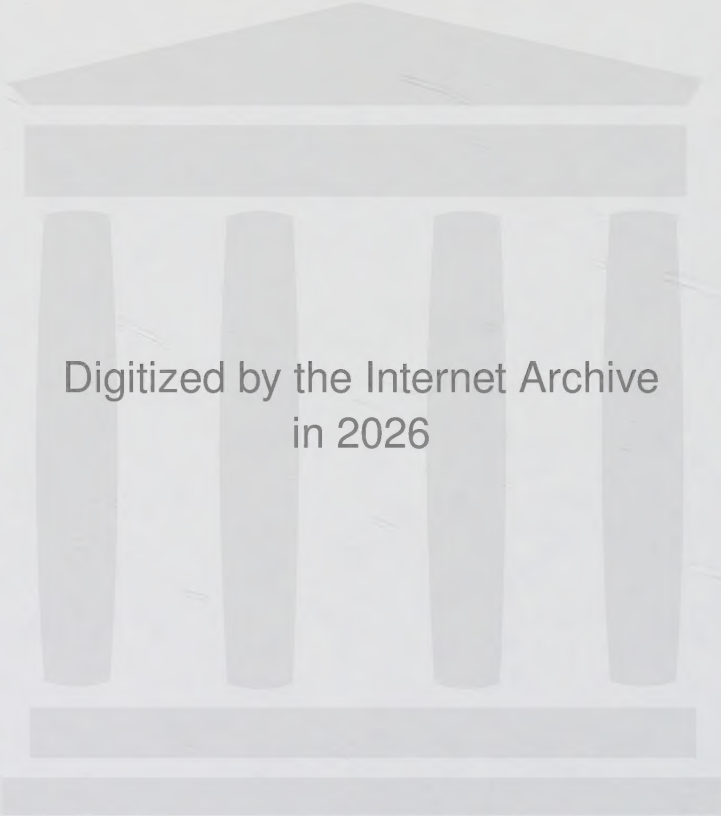
Aus der Medizinischen Klinik im Klinikum Steglitz, Abteilung
für Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie
(Leiter: Prof. Dr. E.O. Riecken)

**Zur Reifung des enteralen Resorptionsepithels
entlang der Zotte: Zytophotometrische Untersuchungen
an der Bürstensaummembran und im apikalen
Zytoplasma, mit kinetischer Charakterisierung der
unspezifischen alkalischen Phosphatase sowie
Quantifizierung des Proteingehaltes.**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Uwe Lange
aus Berlin

1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548822_0027

Aus der Medizinischen Klinik im Klinikum Steglitz,
Abteilung für Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie
(Leiter: Prof.Dr.E.O.Riecken)

Zur Reifung des enteralen Resorptionsepithels entlang
der Zotte: Zytophotometrische Untersuchungen an der
Bürstensaummembran und im apikalen Zytoplasma, mit
kinetischer Charakterisierung der unspezifischen alka-
lischen Phosphatase sowie Quantifizierung des Protein-
gehaltes.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Uwe Lange
aus Berlin

Referent: Privatdozent Dr.med.3.Gutschmidt

Korreferent: Prof. Dr. R. Gossrau

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 01. Okt. 1985

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. <u>Einleitung</u>	5
2. <u>Material und Methode</u>	
2.1 <u>Versuchstiere</u>	
2.2 <u>Gewebevorbehandlung</u>	
2.2.1 Herstellung von unfixierten Kryostatschnitten für die enzymatischen Reaktionen	12
2.2.2 Herstellung der Schnitte für die Proteinfärbungen	
2.2.3 Homogenatherstellung	
2.3 <u>Enzymatische Techniken</u>	
2.3.1 DPP IV, α/β -Glukosidase	13
2.3.2 Alkalische Phosphatase (Histochemie)	
2.3.3 Alkalische Phosphatase (Biochemie)	14
2.4 <u>Proteinfärbungen</u>	
2.4.1 Naphthol-Yellow-S (NYS)	15
2.4.2 Dinitrofluorobenzol (DNFB)	
2.4.3 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)	
2.5 <u>Mikrodensitometrie</u>	
2.5.1 Meßgerät	16
2.5.2 Meßtechniken allgemein	
2.5.2.1 Vorbemerkung	
2.5.2.2 Spektrenaufnahmen	
2.5.2.3 "Pfahlmessungen"	17
2.5.2.4 "Querprofilmessungen"	
2.5.2.5 Kontinuierliches zweidimensionales Scannen	18
2.5.3 Meßtechnisches Vorgehen bei den einzelnen Färbungen	
2.5.3.1 Alkalische Phosphatase	
2.5.3.1.1 Spektrenaufnahmen	
2.5.3.1.2 "Pfahlmessungen"	19
2.5.3.1.3 "Querprofilmessungen"	
2.5.3.1.4 Kontinuierliches zweidimensionales "Scannen"	
2.5.3.2 DPP IV, α/β -Glukosidase	
2.5.3.2.1 "Querprofilmessungen"	20
2.5.3.3 Proteinfärbungen	

	Seite
2.5.3.3.1 Spektrenaufnahmen	
2.5.3.3.2 "Pfahlmessungen"	
2.5.3.3.3 "Querprofilmessungen"	
2.5.3.4 Nukleinsäurefärbungen	
2.5.3.4.1 Spektrenaufnahmen	
2.5.3.4.2 "Pfahlmessungen"	
2.5.3.4.3 "Querprofilmessungen"	
<u>2.6</u> Berechnungen	21
 <u>3.</u> <u>Ergebnisse</u>	
3.1 Optische Eigenschaften der Farbstoffniederschläge	23
<u>3.2</u> Direkter und indirekter Nachweis der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes	28
<u>3.3</u> Kinetische in-situ-Charakterisierung der unspe- zifischen alkalischen Phosphatase	
3.3.1 Vorbemerkungen	
3.3.2 Grenzbedingungen der Methode	
3.3.2.1 Prüfung der optischen Quantifizierbarkeit	
3.3.2.2 Prüfung von steady-state-Bedingungen	36
3.3.2.3 Enzymaktivitätsbestimmungen im Homogenat	37
3.3.2.4 Zusammenfassung	
3.3.3 Anwendungen	
3.3.3.1 Kontinuierliches zweidimensionales Scannen	40
3.3.3.2 "Pfahlmessungen"	42
3.3.3.3 "Querprofilmessungen"	45
<u>3.4</u> "Querprofilmessungen" an einzelnen Enterozyten	47
3.5 Messungen der Enzymaktivität und des Protein- gehaltes an sechs verschiedenen Zottenorten	48
 <u>4.</u> <u>Diskussion</u>	53
 <u>5.</u> <u>Zusammenfassung</u>	62
 <u>6.</u> <u>Literatur</u>	64

1. Einleitung

Adaptationsvorgänge der intestinalen Mukosa können morphologisch und funktionell definiert werden (Dowling und Riecken 1974; Robinson 1983). Untersuchungen zu verschiedenen Umformungstypen der Schleimhautarchitektur (Riecken und Martini 1973) und ihren funktionellen Auswirkungen aus diesem Arbeitskreis haben gezeigt, daß morphometrische Parameter und digestiv absorptive Kapazität in unterschiedlicher Wechselwirkung zueinander stehen und divergent verändert sein können (Menge et al. 1976, 1979; Menge und Robinson 1978). Von daher entstand das Anliegen, Funktion, z.B. Enzymaktivität in der Bürstensaummembran oder in vivo Glukose-Absorption, direkt auf morphologische Meßgrößen beziehen zu können. Im Falle der Glukose-Schwundraten pro Zentimeter Darmlänge - gemessen unter "in vivo" Perfusionsbedingungen - ergab sich eine direkte positive Korrelation mit den Zottenhöhen (Bloch et al. 1973), welche ihrerseits mit den Zottenoberflächen, dreidimensional morphometrisch ermittelt nach Mikrodissektion (Clarke 1970), korrelieren (Riecken et al. 1976). Ebenfalls signifikant mit der Zottenoberfläche korrelieren die "in vitro" Akkumulationsraten für Cl₄-L-Phenylalanin (Menge und Riecken 1978). Für die Disaccharidasen und zwei Membranproteasen der Bürstensaummembran als funktionelle Parameter für digestive Kapazität gelang es, mittels optischer Quantifizierung und kinetischer Charakterisierung am Gewebsschnitt apparente "in situ" K_m - und V_{max} -Werte in direktem Bezug zu Gruppen einzelner Enterozyten an verschiedenen Höhenpositionen entlang der Zotte, d.h. also während der Ausreifung der Resorptionszellen zu beschreiben (Gutschmidt et al. 1979, 1980; Gutschmidt 1981; Gutschmidt und Gossrau 1981; Hopert und Gutschmidt 1982). Im normalen Rattendarm ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen dieser funktionell-enzymatischen "in situ" Meßgröße und einem morphometrischen Parameter, nämlich der Zottenoberfläche als Maß für die Anzahl der Enterozyten auf der Zotte, beschreiben:

Dieser Parameter steht in signifikantem Zusammenhang mit den maximal auf der Zotte, d.h. im oberen Zottendrittel "in situ" erfaßbaren Enzymaktivitäten bzw. dem Quotienten aus dieser Aktivität mit der zugehörigen Minimalaktivität an der Zottenbasis (Gutschmidt et al. 1983a, Hopert und Gutschmidt 1982). Diese Zusammenhänge können im Rahmen adaptativer Phänomene unterschiedlich verändert sein, und so zeigte sich bei der Analyse tierexperimenteller Modelle, wie Zustand nach proximaler Resektion, selbstfüllender und selbstentleerender Blindschlingen, isolierter Galleableitung ins Ileum oder Schilddrüsenhormongabe, daß die Muster der "in situ"-Disaccharidasenaktivitäten different von den zum Teil gleichförmigen morphologischen Umformungsvorgängen alteriert waren (Gutschmidt und Emde 1981; Gutschmidt et al. 1982a, 1982b, 1983d, 1983c). Darüber hinaus zeigten Laktase/ β -Glukosidase auf der einen und neutrale α -Glukosidase auf der anderen Seite zum Teil gegensinnige Reaktionen der "in situ"-Aktivität, so daß sich nicht nur die Frage nach dem "in situ"-Aktivitätsmuster eines weiteren, wesentlich an der Gesamtaktivität der Bürstensaummembran beteiligten Enzymes, nämlich der alkalischen Phosphatase (Seetharam et al. 1977), ergab, sondern auch nach der Basis für diese Veränderungen: Verändert sich im wesentlichen die Affinität der Enzyme zu ihrem Substrat oder ist es überwiegend eine Veränderung der Anzahl der Enzymmoleküle, welche sich im Gesamt-Proteingehalt der Bürstensaumregion niederschlagen mußte. Um diese Fragen innerhalb des bisher untersuchten Systems, nämlich direkt am Gewebsschnitt, beantworten zu können, war es erforderlich, Verfahren zur "in situ"-Quantifizierung und -Charakterisierung der unspezifischen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) und zur "in situ"-Quantifizierung des Proteingehaltes in der Bürstensaummembran zu entwickeln.

Mit diesen Problemen beschäftigen sich die ersten beiden Teile der vorliegenden Studie. Auf dem Wege dorthin, sind methodische Fragen der optischen Quantifizierbarkeit geeigneter Proteinfärbeverfahren (Tas et al. 1980) und des histochemischen

Reaktionsproduktes der alkalischen Phosphatase (Burstone 1962) am Schnitt sowie konventioneller biochemischer Vergleichsuntersuchungen, d.h. Beschreibung der Hydrolyse des histochemischen Substrates im Reagenzglas und schließlich Fragen meßtechnischer Art, welche durch die Natur des vorliegenden Meßobjektes im Gewebe bedingt sind, zu beantworten. Nach Bearbeitung dieser Probleme wendet der dritte Teil der Studie dann die vorliegenden "in situ"-Quantifizierungsverfahren für Bürstensaumenzyme und Proteine am Schnitt an, um den normalen basoapikalen Aktivitätsgradienten entlang der Zotte mit möglichen Veränderungen des "in situ"-Proteingehaltes auf gleicher Ebene zu vergleichen.

Losgelöst von dieser Betrachtung zur Interrelation von Struktur und Funktion am intestinalen Resorptionsepithel gibt es noch ein weiteres Motiv, gerade die alkalische Phosphatase auf ihre "in situ"-Quantifizierbarkeit und -Charakterisierbarkeit am Gewebsschnitt hin zu prüfen: Aus der Natur eines solchen Verfahrens ergibt sich, daß es nur kleinster Gewebemengen bedarf - wie zum Beispiel einer 3 mg Zangenbiopsie, gewonnen im Rahmen endoskopischer Untersuchungen - so daß sich ein Weg eröffnen könnte, "in vivo" Veränderungen dieses ubiquitär vorkommenden und in seiner Funktion bislang nicht hinreichend definierten Enzymes (McComb 1979) bioptisch, also auch am Menschen, genauer zu charakterisieren. So ist bislang nicht entschieden, welche Rolle der alkalischen Phosphatase in der Bürstensaummembran des Dünndarmes und des proximalen Nierentubulus bei der Kalziumresorption zukommt. Ältere Befunde von Norman et al. (1970) sprechen sich für eine fördernde Wirkung aus, ihnen wird jedoch von Lane und Lawson (1978) widersprochen; diese Autoren schreiben lediglich der Kalzium-aktivierten ATPase in der Bürstensaummembran und nicht der alkalischen Phosphatase eine Schlüsselstellung bei der Vitamin D-abhängigen Kalziumresorption am Darm zu. Die Wertung früherer Untersuchungen wird dadurch erschwert, daß die unspezifische "alkalische Phosphatase" in der Tat einen "Sammeltopf von Aktivität-

ten darstellt. Am Rattendünndarm konnten Chan und Atkins (1983) aufgrund der Reaktion auf Vitamin D-Entzug und Resubstitution zeigen, daß eine Differenzierung in Kalzium-ATPase, Phytase und alkalische Phosphatase erforderlich ist, welche dann in jeweils unterschiedlicher Kombination in Krypten und Zottenepithel vorliegen und zu Veränderungen der apparenten K_m entlang der Zotte führen. Die Situation wird weiterhin dadurch kompliziert, daß die unspezifische alkalische Phosphatase des Rattendarmes zu ca. 90% in Membran-gebundener und zu 10% in löslicher Form vorliegt (Davies und Flett 1978) - ein Gesichtspunkt, der bei der Gewebepreparation für den histochemischen Nachweis zu berücksichtigen war (Lojda, Cossrau und Schiebeler 1979) - ein thermolabiles Glykoprotein bestehend aus drei Untereinheiten (Saini und Done 1972; Malec und Butterworth 1976; Nakasaki et al. 1979) darstellt, sich aus inaktiven Vorstufen im noch unreifen Kryptzellepithel entwickelt (Wachsmuth und Tohorst 1974) und schließlich entlang der Zotte offenbar unterschiedliche Isoenzymmuster aufweist (Moog und Grey 1968; Simon et al. 1979). Die geringe Empfindlichkeit gegenüber Noxen (wie zum Beispiel bei der Sprue oder im Rahmen von Enteritiden, Gutschmidt 1983) beruht möglicherweise auf einer tieferen und festeren Verankerung des alkalischen Phosphatasenmoleküles in der Bürstensaummembran als wie sie zum Beispiel für das weiter nach luminal ragende Laktasemolekül gegeben ist, dessen Aktivität bei den genannten Erkrankungen sich frühzeitig vermindert. Darüber hinaus besitzt die alkalische Phosphatase im Vergleich zu den Disaccharidasen eine geringere Turn-over-Rate ihres Enzymproteins (Alpers 1972). Die Beziehung der alkalischen Phosphatase des Darmes zu der HCO_3 -stimulierten ATPase ist ebenfalls noch ungeklärt (Humphreys und Chou 1979; Kaysen et al. 1979). Aus diesen Gründen kann man von einer "in situ"-Quantifizierung und -Charakterisierung der unspezifischen alkalischen Phosphatase erhoffen, daß hierdurch an Darm und anderen Organsystemen mit ähnlich komplexen Verhältnissen, wie zum Beispiel am Tubulus-

system der Niere, weitere Möglichkeiten zur näheren Charakterisierung der pathophysiologischen Funktion dieses Enzyms eröffnet werden.

Vermutlich ist es eben diese Schwierigkeit bei der Definition der Enzymaktivität, welche nur sporadische Versuche einer quantitativen Histochemie der alkalischen Phosphatase gestattet hat. Lediglich an Modellsystemen (Ultrasonikate von Blutzellen und verschiedenen Organhomogenaten inkorporiert in Polyacrylamidgele) - jedoch bislang nicht am Gewebsschnitt - wurden Gangbarkeit und Grenzbedingungen einer optischen Quantifizierung mit kinetischer Charakterisierung mittels enzymhistochemischer Azokupplungsverfahren dargelegt (van der Ploeg und van Duijn 1968; Lojda et al. 1967). Kinetische Studien zur alkalischen Phosphatase an halbhistochemischen, also ebenfalls Modellsystemen waren zuvor schon von Hopsu und McMillan (1964) durchgeführt worden, und eine zytophotometrische Quantifizierung der alkalischen Phosphatase "in situ" im Gewebsschnitt ohne kinetische Charakterisierung legte Wachsmuth (1981) für die Niere vor. Ebenfalls mit Azoverfahren am Schnitt, jedoch nur in Form von einfachen Zählungen Phosphatase-positiver Chondrozyten mittels Rasterverfahren ohne zytophotometrische oder kinetische Studien, erarbeiteten Nusbickel et al. (1979). Diese bisher nahezu rein qualitativen Verfahren, die Aktivität der alkalischen Phosphatase, verschiedene Organprovinzen betreffend, so auch Dünndarm (Fric und Lojda 1964) und Dickdarm (Bell und Williams 1979), soll im Rahmen der hier vorgelegten Studie durch ein quantitativ kinetisches Verfahren ergänzt werden.

Das klinische Interesse an Verfahren zur "in situ"-Quantifizierung der alkalischen Phosphatase konzentrierte sich bislang vor allem auf die Niere, wo eine Abnahme der "in situ"-Aktivität (Wachsmuth 1981) verbunden mit einem Aktivitätsanstieg - interessanterweise der intestinalen Isoenzymform - im Urin bei verschiedenen Schädigungsformen (Aminoglykoside, Zustand

nach Transplantation) zu beobachten ist (Fleiderer et al. 1980). Für die Leberpathologie spielten Gewebebestimmungen des Enzymes (Schlaeger et al. 1982) bislang gegenüber der Messung im Serum (Caplan 1972) eine untergeordnete Rolle. Die Serumbestimmung der alkalischen Phosphatasenaktivität ist zwar klinisch bedeutsam, hat jedoch zu berücksichtigen, daß die Gesamtaktivität nicht nur aus der Leber (McKenna et al. 1979), sondern auch aus dem Knochen (Seargeant und Stinson 1979), dem Darm (Arfors et al. 1963) und gegebenenfalls der Placenta (Fernley 1971) resultiert. Die Serumaktivität wurde benutzt zur Erfassung einer vermehrten entzündlichen Aktivität bei Lebererkrankungen (Burlina und Bugiardini 1978) und der Serumkomplex des Enzymes mit Lipoprotein X zur Dokumentation einer Cholestase (Weijers 1980). Möglicherweise können sich in Zukunft hier direkte "in situ"-Verfahren im Rahmen bioptischer Untersuchungen der Leber als Überlegen erweisen. Weitere potentielle Anwendungsgebiete einer "in situ" alkalischen Phosphatasenquantifizierung im Rahmen klinischer Biopsiediagnostik ergeben sich für die mögliche Differenzierung von Duodenalulcera (Stiel et al. 1983; Gutschmidt 1983), in der Cancerogenese (bisher in vitro Befunde, Morita et al.; Cancer 1982; Dolbeare et al. 1980), in der Perinatalpathologie (alkalische Phosphatase generell als Indikator für Zellreife, so auch bei der fetalen Lungenentwicklung, Brocklehurst und Wilde 1980) und nicht zuletzt natürlich auch in der Hämatologie (Kaplow 1968; Williams et al. 1979).

Auch bei den Proteinfärbungen gibt es bereits eine Reihe von Untersuchungen zur optischen Quantifizierung an Modellsystemen (Tas et al. 1978, 1980). Ihre Anwendung in der intestinalen Gewebediagnostik stand bisher noch aus, so daß das methodische Anliegen dieser Studie die Auswahl unter den vorgegebenen Verfahren ist, welche sich an den etablierten Kriterien für die optische Quantifizierung orientiert. Gewebeart und Vorbehandlung sind hier von entscheidender Bedeutung, da sie sowohl die

Bindung der farbigen Reaktionsprodukte an das Gewebe (Zanker 1981) als auch ihre optischen Eigenschaften (Gutschmidt 1980) zu beeinflussen vermögen. Darüber hinaus ergibt sich auch für den Proteinnachweis das Spezifitätsproblem in dem Sinne, daß jede Färbung nur bestimmte reaktive Gruppen erfassen kann und nicht - wie bei immunhistochemischen Reaktionsverfahren - ein definiertes Enzymprotein.

In Kenntnis der sich aus diesen einleitenden Bemerkungen ergebenden Limitationen sowohl für den alkalischen Phosphatase-nachweis als auch für die Proteinfärbungen hinsichtlich ihrer jeweiligen Spezifität soll nun folgend die Gangbarkeit der "in situ" optischen Quantifizierung bzw. kinetischen Charakterisierung am Beispiel von Gewebsschnitten intestinaler Mukosa der Ratte dargelegt werden, um ein weiteres Werkzeug für eine optimierte Biopsie bzw. Gewebediagnostik zu erarbeiten. Teile der vorliegenden Studie sind bereits publiziert worden (Gutschmidt, Lange und Riecken 1980 und 1981).

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Sechs weibliche erwachsene Wistarratten mit einem Körpergewicht von 200 - 250 g wurden eine Woche lang unter Standardbedingungen gehalten: Temperatur $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 Stunden-Licht-Zyklus, Standardernährung, Leitungswasser ad libitum. Die Tiere wurden dann zwischen 15.00 Uhr und 17.00 Uhr nach Ätheranästhesie durch Kardiotorie getötet und ca. 10 cm Jejunum distal der Flexura duodeno jejunalis gewonnen. Der Darm wurde anschließend mit 0,9%iger eisgekühlter NaCl-Lösung gespült, um Verunreinigungen zu entfernen.

2.2 Gewebevorbehandlung

2.2.1 Herstellung von unfixierten Kryostatschnitten für die enzymatischen Reaktionen

Der proximale Teil des Jejunums von ca. 1 cm Länge wurde mit dem Mesenterium nach unten auf einem Korkplättchen zwischen zwei Leberstücken eingebettet, danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Plastiktüte versiegelt für zwei Wochen bei -25°C aufbewahrt.

Von dem Präparat wurde in der Folge mit einem Pearse-SLEE-Kryostaten bei -20°C in Serienfolgesschnitte von $10\text{ }\mu\text{m}$ Dicke oder wahlweise, für den Schnittdickenversuch, entsprechend mit Schnittdicken von $4\text{ }\mu\text{m}$ bis $18\text{ }\mu\text{m}$ (Schrittweite $2\text{ }\mu\text{m}$) angefertigt.

Die Schnitte (jeweils Doppelschnitte) wurden auf Deckgläschen (für die Enzymreaktion, jeweils 2 Deckgläschen mit aufeinanderfolgenden Schnitten, Rücken an Rücken in Columbia Jars) oder Objektträgern (für die Proteinfärbungen, jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger) aufgenommen und bis zum folgenden Tag im Kryostaten bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2 Herstellung der Schnitte für die Proteinfärbungen

Für die Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbungen (CBB) wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Schnitte, die mit Naphthol Yellow S (NYS) und 2-4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) gefärbt werden sollten, wurden gleich nach dem Schneiden für 24 Stunden in 4% Kalzium-Formalin 1% postfixiert.

2.2.3 Homogenatherstellung

Der verbleibende Teil des Jejunums (vergl.: Versuchsmaterial) wurde longitudinal aufgeschnitten und, mit der Mukosa nach oben, auf eine Glasplatte gelegt. Dann wurde die Mukosa mit einem Objektträger abgeschabt, in Parafilm^R eingewickelt und nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff für eine Woche bei -25°C gelagert.

Die Homogenisierung des Geschabsels (15 mg auf 1 ml 0,9%iger NaCl, Wiegen beim Auftauen, optimales Volumen: 2,5 ml) erfolgte in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (2 Minuten, 1000 Umdrehungen/Minute, Teflon-Stößel).

Das Homogenat wurde dann bei 4°C in englumigen Reagenzgläsern (Sedimentation der größeren Partikel) aufbewahrt und eine Stunde nach Zubereitung weiterbearbeitet.

2.3 Enzymatische Techniken

2.3.1 DPP IV, α -Glukosidase, β -Glukosidase

Die quantitativen histochemischen Enzymreaktionen für die neutrale α -Glukosidase und Laktase/ β -Glukosidase erfolgten im $V_{\max}$ -Bereich der Hydrolyse der jeweiligen Substrate entsprechend der von Gutschmidt et al. beschriebenen Vorgehensweise (Gutschmidt et al. 1979, 1980; Gutschmidt 1981).

Für die Dipeptidylpeptidase IV-Reaktion in der Bürstensaummembran wurden die Schnitte 5 Minuten bei 37°C mit einer

frisch filtrierten 3,06 mmol Gly-Pro-4 Methoxy-2 Naphtylamid Lösung, zubereitet in 0,1 M Phosphatpuffer und vermischt mit 1 mg/ml Fast Blue B (Gutschmidt u. Gossrau 1981), inkubiert.

2.3.2 Alkalische Phosphatase (Histochemie)

Als Substrat diente Naphthol-AS-BI-Phosphat (MW 496,2, 1 mg gelöst in 20 µl N:N-Dimethylformamid).

Durch Zugabe entsprechender Mengen von Tris-HCL-Puffer, pH 8,3, unter Berücksichtigung des Volumens der noch hinzuzufügenden Fast Blue B-Kuppler-Lösung (1 mg/ml) wurden Substratlösungen mit Konzentrationen von 0,025 mmol bis 1,5 mmol hergestellt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte in temperierten Columbia Jars (37°C, Wasserbad).

Die Reaktion wurde durch Eingießen der frisch zubereiteten Substrat-Kuppler-Lösung in die Columbia Jars gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten (oder beim Zeitvariationsversuch entsprechend nach 0,5; 1,0 ... 5,0 Minuten) erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Abgießen der Inkubationslösung und Einbringen der Schnitte in eiskaltes Wasser für 5 Minuten.

Die Präparate wurden dann für mehrere Stunden in 4% Kalzium-Formalin 1% postfixiert, danach 2 Minuten in fließendem Wasser gespült und in Kaiser's Glyceringelatine (60°C) eingebettet. Bis zur Messung erfolgte die Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C.

2.3.3 Alkalische Phosphatase (Biochemie)

Für die Ermittlung der Reaktionskinetiken wurden Naphthol-AS-BI-Phosphatlösungen (MW 496,1, 1 mg gelöst in 20 µl N:N-Dimethylformamid) unterschiedlicher Konzentrationen (0,05 mmol bis 3,0 mmol, in 0,1 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,3) hergestellt. Als erstes wurden dann jeweils 100 µl Homogenat mit 100 µl Substratlösung der entsprechenden Konzentrationen für 3 Minuten bei 37°C inkubiert (zwei Ansätze pro Versuchstier).

Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Reagenzgläser für 2 Minuten in kochendes Wasser eingebracht und danach für 5 Minuten in schmelzendes Eis gestellt.

Zusätzliche Kontrollen liefen dazu parallel: Ein Reagenzglas mit 200/ μ l Puffer (Reaktionsleerwert), ein Reagenzglas mit 100/ μ l Homogenat und 100/ μ l Puffer (zur Prüfung auf unspezifische Reaktionen im Homogenat) und ein Reagenzglas mit 100/ μ l Substratlösung und 100/ μ l Puffer (zur Registrierung einer spontanen Substrathydrolyse).

Die Bestimmung des spezifischen Substratumsatzes erfolgte mittels Messung des Naphthol als Reaktionsprodukt in einem von der Substrathydrolyse getrennten zweiten Schritt: 0,5 ml FBB-Lösung als Kuppler (25 mg FBB gelöst in 4 ml N:N-Dimethylformamid und 21 ml Tris-HCL-Puffer, pH 7,4) wurden zu jedem der Ansätze hinzugefügt und diese dann 5 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen (sog. Postkupplungsverfahren, Gossrau 1976, Gutschmidt et al. 1979).

Nach Extraktion mit 1,5 ml Äthylacetat für 30 Sekunden und weiterem Stehenlassen für 20 Minuten erfolgten danach die Messungen bei 550 nm (1 cm optische Wellenlänge, PQ-20-Zeiss-Spektrophotometer) in der organischen Phase gegen den in gleicher Weise behandelten Reaktionsleerwert.

2.4 Proteinfärbungen

2.4.1 Naphthol-Yellow-S

Entsprechend einer Modifikation der Vorgehensweise von Deitch (1955) und Tas et al. (1978) erfolgte nach 24 Stunden Post-fixation (4% Kalzium-Formalin 1%) und 5 Minuten Spülen in fließendem Wasser das Färben in 0,1% NYS-Lösung (in 1% Essigsäure) für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Objektträger wurden danach, ohne sie abtropfen zu lassen, nacheinander in 3 verschiedene 1%ige Essigsäurebäder eingebracht (30 Sekunden, 5 Minuten, 15 Minuten) und nach Abtropfen, in der Folge dann in reinen tertiären Butylalkohol sowie

3 Xylolbäder (Lufttrocknen zwischen jedem Dehydrations-schritt). Das Einbetten erfolgte in Entellan^R.

2.4.2 2-4-Dinitrofluorobenzol

Vorgehensweise nach Zerlotti und Engel (1962): Nach Postfixa-tion 24 Stunden Färbung in einer Lösung von 1 ml DNFB in 30 ml absolutem Äthanol und 15 ml wässrigem 1 mol NaHCO_3 (Filtrie-ren der Lösung, um Bikarbonatpräzipitate zu entfernen). Die Schnitte wurden dann jeweils 10 Minuten in den folgenden Lösungen gespült: 75%iger Alkohol, warmes destilliertes Wasser (30°C), 75%iger Alkohol, 95%iger Alkohol und 95% Alkohol Äther (1:1). Daran anschließend Einbringen in Xylol (zwei Bäder jeweils 5 Minuten) und Einbetten in Entellan^R.

2.4.3 Coomassie Brilliant-Blue G 250

Entsprechend dem Mikroassay von Sedmark und Grossberg (1977): Färbungen unfixierter Schnitte in einer 0,06%igen CBB-Lösung in 1,9% Perchloressigsäure (w/v), die vor Gebrauch frisch fil-triert wurde; danach: Lufttrocknen, Einbringen in eiskaltes Wasser für 5 Minuten und abschließend Einbetten in Kaiser's Glyceringelatine (60°C).

2.5 Mikrodensitometrie

2.5.1 Meßgerät

Die Messungen wurden an einem Leitz MPV 2-Mikroskopphotometer, ausgerüstet mit stabilisierter Lichtquelle (Xenon-Hochdruck-lampe), Gittermonochromator, Feinscanning-Einrichtung in der Objektebene und einem HP 98-15 Tischrechner als Steuereinheit durchgeführt.

2.5.2 Meßtechniken

2.5.2.1 Vorbemerkungen

Die Meßfeldgröße wurde mit $4 \times 4 \text{ } \mu\text{m}$ so ausgewählt, daß das Meßfeld stets völlig von farbigem Niederschlag ausgefüllt war (Minimierung des sog. Verteilungsfehlers). Das Leuchtfeld hatte die ca. 1,5-fache Kantenlänge des Meßfeldes, um das Auftreten von Scheinextinktionen - bedingt durch Beugeartefakte - zu vermeiden. Als Referenzmeßorte (Eichungen auf Transmission = 100%) dienten entweder ungefärbtes Gewebestroma oder Glas. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Meßtechniken angewendet.

2.5.2.2 Spektrenaufnahmen

Der Meßstrahl wird unter Kontrolle des Auges in die Position gebracht, in der das Meßfeld vollständig von Farbstoffniederschlag ausgefüllt ist. Dann wird die Wellenlänge des monochromatischen Lichtes automatisch in Schritten von 10 nm variiert und bei jedem Schritt die Extinktion bestimmt. Als Referenzwert diente Glas.

Neben der Bestimmung des Absorptionsmaximums für den jeweiligen Farbstoff erfolgte mit Hilfe der Spektrenaufnahmen auch die indirekte Prüfung desjenigen Teils des Lambert-Beer'schen Gesetzes, welches die proportionale Abhängigkeit der Extinktion von der Farbstoffkonzentration beschreibt. Hierzu wurden mehrere Spektrenaufnahmen eines Farbstoffes an Orten augenscheinlich unterschiedlicher Akkumulation in verschiedenen dicken Schnitten durchgeführt.

2.5.2.3 "Pfahlmessungen"

Der Meßstrahl wird unter Kontrolle des Auges in die Position gebracht, in der die Absorption des jeweiligen Farbstoffniederschlages gemessen werden soll (monochromatisches Licht

entsprechend der vorher ermittelten Absorptionsmaxima) und dann die Extinktion bestimmt. Dieses Verfahren einer optischen Quantifizierung wird als "Ein-Meßfeld-ein-Wellenlängen"-Verfahren bezeichnet. Der Ausdruck "Pfahlmessungen" ("plug measurements") entstammt der Tatsache, daß mit dieser Technik quasi ein Lichtpfahl ("plug") durch das Meßobjekt geleitet wird (Sandritter 1966; Mayall und Mendelsohn 1970). Als Referenzwerte dienten Glas oder Stroma.

2.5.2.4 "Querprofilmessungen"

Hierzu wird der Meßstrahl (monochromatisches Licht entsprechend der vorher ermittelten Absorptionsmaxima) unter Kontrolle des Auges in seine Ausgangsposition gebracht (Lumen links der auszumessenden Zotte) und dann automatisch in Schritten von $1/\mu\text{m}$ nach rechts über das Resorptionsepithel bis ins Stroma fortbewegt, wobei bei jedem einzelnen Schritt die Extinktion gemessen wird. Es wird also ein "Profil" von Extinktionsmessungen quer zur Zottenlängsachse durch das Resorptionsepithel gelegt. Als Referenzwerte dienten Glas und Stroma.

2.5.2.5 Kontinuierliches zweidimensionales "Scannen"

Hierbei handelt es sich im Prinzip um Querprofilmessungen, die entlang der gesamten Zotte rechnergesteuert von apikal nach basal jeweils um eine Zeile versetzt durchgeführt werden und somit ein vollständiges Profil der Farbstoffablagerung im Resorptionsepithel der entsprechenden Zotte liefern (vgl. Gutschmidt et al. 1980).

2.5.3 Meßtechnisches Vorgehen bei den einzelnen Färbungen

2.5.3.1 Alkalische Phosphatase

2.5.3.1.1 Spektrenaufnahmen

Zur Bestimmung des Absorptionsmaximums und zur indirekten Prüfung des zweiten Teils des Lambert-Beer'schen Gesetzes Aufnahme von Spektren an Orten verschiedener Farbstoffakkumulation am Schnitt: Schnittdicke $10/\mu\text{m}$, Substratkonzentration $0,5 \text{ mmol}$, Inkubationszeit 3 Minuten.

2.5.3.1.2 "Pfahlmessungen"

Bestimmung der Beziehung zwischen Schnittdicke und Extinktion (erster Teil des Lambert-Beer'schen Gesetzes): λ 500 nm und 550 nm, Messungen am Übergang mittleres zu oberem Zotten-drittel, Substratkonzentrationen $0,5 \text{ mmol}$ und $1,5 \text{ mmol}$, Inkubationszeit 3 Minuten, 1 Doppelschnitt pro Schnittdicke, 5 Zotten pro Schnitt, 2 Pfahlmessungen pro Zotte (links und rechts).

Bestimmung der Beziehung zwischen Inkubationszeit und Extinktion zur Prüfung der Frage, wie lange pro Zeiteinheit gleiche Farbstoffmengen durch die Enzymreaktion entstehen (steady state-Bedingungen der Substrathydrolyse): Ein Doppelschnitt pro Inkubationszeit, Schnittdicke $10/\mu\text{m}$, sonst wie oben.

Bestimmung der Beziehung zwischen Substratkonzentration und Extinktion unter Berücksichtigung der Grenzbedingungen (Extinktionsmaximum, Zeit- und Schnittdickenlinearität), d.h.

Bestimmung der Enzymkinetik: Messungen im unteren Zotten-drittel und am Übergang vom mittleren zum apikalen Zotten-drittel, $\lambda = 550 \text{ nm}$, Schnittdicke $10/\mu\text{m}$, Inkubationszeit 3 Minuten, 6 Tiere, ein Doppelschnitt pro Tier und Substratkonzentration, 5 Zotten pro Schnitt, 2 Messungen pro Zottenort (rechts und links).

Bei einem Tier wurden also 160 Einzelmessungen pro Zottenort

für die Ermittlung einer Reaktionskinetik verwendet (Doppelbestimmung).

2.5.3.1.3 "Querprofilmessungen"

Bestimmung der Beziehung zwischen "summierten" Extinktionswerten (= Extinktionswerten eines einzelnen Querprofiles, Einzelheiten s.u.) und Substratkonzentrationen als alternative Technik zur Ermittlung einer Enzymkinetik: Jeweils zwei Zeilen (= Querprofile) am Übergang vom mittleren zum apikalen Zotten-drittel, ein Tier, fünf Zotten pro Substratkonzentration, λ 550 nm, Inkubationszeit 3 Minuten, Schnittdicke $10/\mu\text{m}$.

Bestimmung der Beziehung zwischen "summierten" Extinktionswerten und Zottenort (kinetische "in situ"-Charakterisierung des Enzyms): λ 550 nm, V_{max} -Bereich der Hydrolyse, Schnittdicke $10/\mu\text{m}$, jeweils zwei Zeilen an sechs unterschiedlichen Zottenpositionen (basal = 6, apikal = 1), ein Doppelschnitt, fünf Zotten pro Schnitt.

2.5.3.1.4 Kontinuierliches zweidimensionales "Scannen"

Bestimmung der mittlerern Extinktionen pro Zeile (Querprofil) der entsprechenden, mit Farbstoff bedeckten Flächen sowie des Produktes beider in Beziehung zum Zottenort (kinetische "in situ"-Charakterisierung des Enzyms): λ 550 nm, Schnittdicke $10/\mu\text{m}$, "Scannen" der linken Seite zweier verschiedener Zotten.

2.5.3.2 DPP IV, α/β -Glukosidase

2.5.3.2.1 "Querprofilmessungen"

Bestimmung der Beziehung zwischen "endgültigen" Extinktionswerten und Zottenort (kinetische "in situ"-Charakterisierung der Enzyme): V_{max} -Bereich der Hydrolyse, entsprechend dem jeweiligen Absorptionsmaximum des Farbstoffes (vergl. Gutschmidt et al. 1979, 1980; Gutschmidt 1981), Schnittdicke

10/ μ m, jeweils zwei Zeilen an sechs unterschiedlichen Zottenpositionen (basal = 6, apikal = 1), ein Doppelschnitt, fünf Zotten pro Schnitt.

2.5.3.3 Proteinfärbungen

2.5.3.3.1 Spektrenaufnahmen

Bestimmung der jeweiligen Absorptionsmaxima und Prüfung des zweiten Teils des Lambert-Beer'schen Gesetzes (s.o.): Schnitt-dicke 10/ μ m.

2.5.3.3.2 "Pfahlmessungen"

Bestimmung der Beziehung zwischen Schnittdicke und Extinktion (erster Teil des Lambert-Beer'schen Gesetzes): λ 440 nm (NYS), λ 400 nm (DNFB), λ 610 nm (CBB), Messungen am Übergang vom mittleren zum oberen Zottendrittel, ein Doppelschnitt pro Schnittdicke, fünf Zotten pro Schnitt, zwei Pfahlmessungen pro Zotte (rechts und links).

2.5.3.3.3 "Querprofilmessungen"

Bestimmung der Beziehung zwischen pro Meßzeile "summierten" (Details zur Bestimmungsmethode dieses Wertes siehe Abschnitt 3.4) Extinktionswerten und Zottenort (Charakterisierung des Verlaufs des Proteingehaltes entlang der Zotte): λ 440 nm (NYS), λ 400 nm (DNFB), Schnittdicke 10/ μ m, jeweils zwei Zeilen an sechs unterschiedlichen Zottenpositionen (basal = 6, apikal = 1), ein Doppelschnitt, fünf Zotten pro Schnitt.

2.6. Berechnungen

Von den Meßwerten wurden Mittelwerte, $x \pm \text{SEM}$, und Mediane gebildet. Die Prüfung der Heterogenität der Werte bei Variation der Schnittdicke und Inkubationszeit erfolgte jeweils mittels

einfacher Varianzanalyse (F-Test).

Ergab sich dabei Heterogenität, so wurden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten anhand von t-Testen ermittelt. Im Falle der Frage nach linearer Beziehung zwischen einer als unabhängig gesetzten Variable (z.B. der Schnittdicke oder der Zeit) und der Extinktion wurden dann mit den signifikant unterschiedenen Extinktions-Gruppen-Mittelwerten (z.B. pro Schnittdicke) eine einfache Regression durchgeführt, deren Signifikanz mit Hilfe entsprechender Tabellen für die Regressionskoeffizienten (r) unter Berücksichtigung von n (der Anzahl der eingegebenen Mittelwerte) geprüft wurde.

Da bei den initialen Einzelwerten nicht unbedingt eine Normalverteilung zugrunde gelegt werden konnte, kamen zusätzlich, der Einweg-Varianzanalyse entsprechende, jedoch nichtparametrische Testverfahren zur Anwendung: Der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem multiplen Vergleich nach Nemenyi (Sachs 1974) oder der Wilcoxon-Test, sowie der Zweiweg-Varianzanalysen entsprechend, der Friedmann-Rank-Test mit nachfolgendem multiplen Vergleich nach Wilcoxon und Wilcox (Sachs 1974).

Die Berechnung der apparenten kinetischen Daten erfolgte mit zwei voneinander unabhängigen Verfahren: Die graphische Methode des direkt linearen Plots nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) und eine modifizierte kleinste Abstandsquadrat-Methode des doppelt reziproken Plots, nämlich die gewichtete Regressionsanalyse (Wilkinson 1961, Cleland 1967). Die hierdurch ermittelten Daten apparenter kinetischer Konstanten wurden zur Berechnung "idealer" Kurven für die Sättigungskinetik verwendet und dann direkt mit den experimentellen Daten verglichen.

Da beide Ermittlungsverfahren für K_m und V_{max} gegenüber Fehlermöglichkeiten in unterschiedlicher Weise empfindlich sind (Atkins et al. 1978; Atkins und Nimmo 1980), wurde die Übereinstimmung der Werte als weiteres Argument für das Vorliegen einer Sättigungskinetik gewertet.

3. Ergebnisse

Die ersten Abbildungen zeigen beispielhaft für die Protein- und Enzymreaktionen im Schnitt einmal Jejunalzotten nach Coomassie-Brillant-Blue G 250-Reaktion (Abb. 1) und zum anderen nach Darstellung der unspezifischen alkalischen Phosphatase (Abb. 2). Man sieht im ersten Fall eine mehr oder weniger ubiquitäre Färbung (Proteindarstellung) und im zweiten Fall ein auf die Bürstensaumregion beschränktes farbiges Reaktionsprodukt, welches sich deutlich von der Umgebung absetzt.

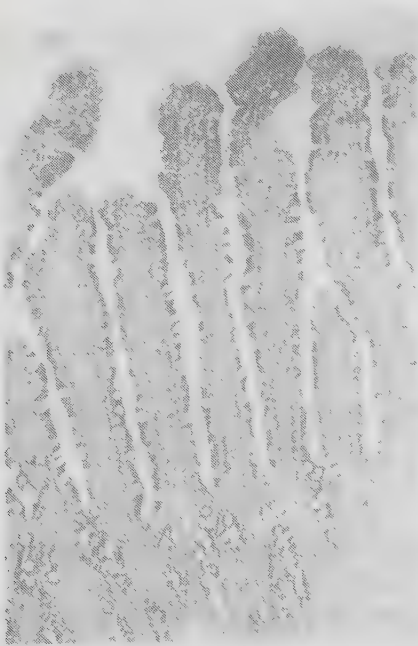


Abb. 1:

CBB - Färbung, unfixierter Kryostatschnitt, Objektiv-
vergrößerung $\times 24$



Abb. 2:

Unfixierter Kryostatschnitt, Darstellung der unspezifischen alkalischen Phosphatase: 1,0 mM Naphtol-AS-BI-Phosphat und 1 mg/ml Fast Blue B (3 min bei 37°C), Objektivvergrößerung x 24

3.1 Optische Eigenschaften der Farbstoffansammlungen

Die automatisch aufgenommenen fortlaufenden Extinktionsspektren der einzelnen Färbungen ergaben an Orten augenscheinlich unterschiedlicher Farbstoffablagerung bei Schnitten gleicher Dicke und gleicher Inkubationszeit ähnlich verlaufende Kurven; alkalische Phosphatase (Abb. 3), Naphtol-Yellow-S (Abb. 4), Dinitrofluorobenzol (Abb. 5) und Coomassie-Brillant-Blue G 250 (Abb. 6).

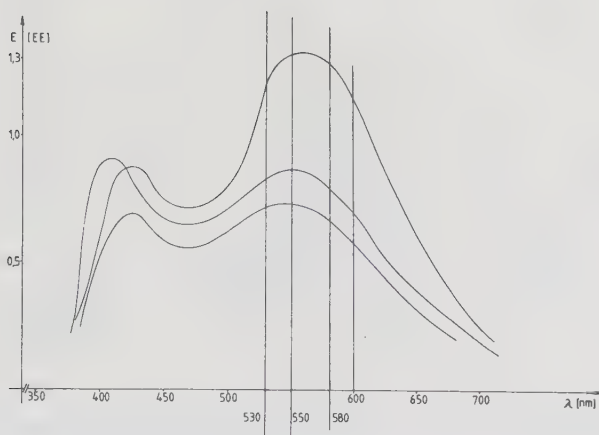


Abb. 3:

Alkalische Phosphatase-Reaktion; "in situ"-Extinktionsspektren an Orten verschieden starker Farbstoffakkumulation in Schritten von $\lambda = 10$ nm aufgenommen, Kennzeichnung der Wellenlängen für die Berechnungen zum indirekten Nachweis der Anwendbarkeit des Lambert-Beer-Gesetzes (λ 530, 550 und 580); E = Extinktion (Ordinate) in Extinktionseinheiten (EE); λ = Wellenlänge (Abszisse).

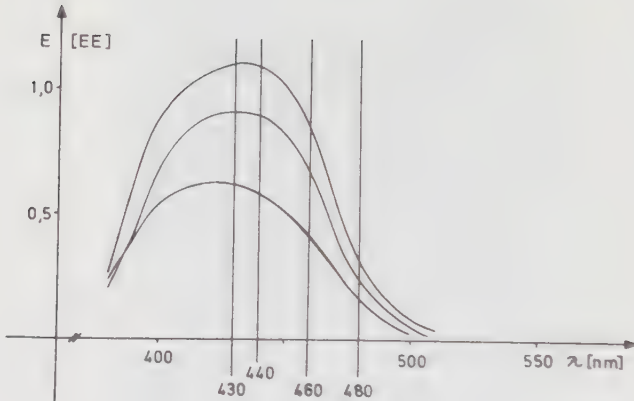


Abb. 4:

Proteinfärbung mit Naphthol Yellow S; "in situ"-Extinktions-spektren (vergl. Legende zur Abb. 3).

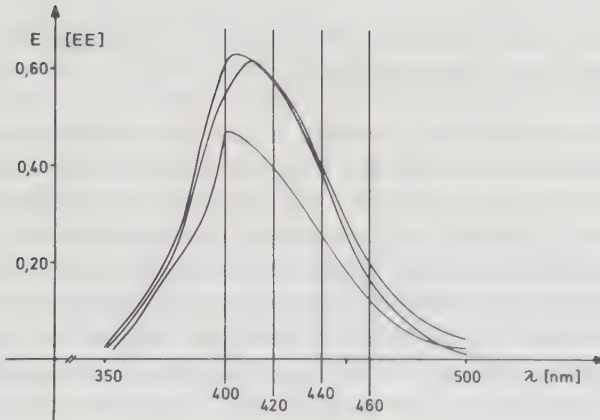


Abb. 5:

Proteinfärbung mit Dinitrofluorobenzol; "in situ"-Extinktionsspektren (vergl. Legende zu Abb. 3).

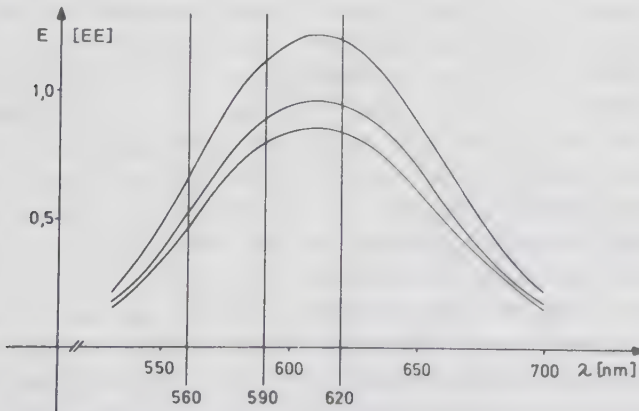


Abb. 6:

Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250; "in situ"-Extinktionsspektren (vergl. Legende zu Abb. 3).

3.2. Direkter und indirekter Nachweis der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes

Als indirekter Beweis des zweiten Teiles des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Extinktion als lineare Funktion der Farbstoffkonzentration) sollte der Nachweis dienen, daß die Extinktionsspektren, die sich an Orten unterschiedlicher Farbstoffakkumulation ergeben, jeweils ähnlich geformt sind. Hierzu wurden die Extinktionen bei Wellenlängen außerhalb des Extinktionsmaximums (Ordinate) gegen diejenigen im Maximum (Abszisse) aufgetragen (Abb. 7, 8, 9 und 10 und Tab. 1) und zum Beweis "gleichgeformter" Spektrenverläufe jeweils die linearen Regressionen gebildet.

Für die Proteinfärbung mit NYS war diese lineare Regression für den Wellenlängenbereich zwischen λ 430 nm und λ 460 nm hoch signifikant, gemessen an den Werten für n (Zahl der analysierten Spektren und r (Regressions/Korrelationskoeffizient s. Tab. 1), so daß in diesem Bereich von der Gültigkeit einer linearen Beziehung zwischen Farbstoffkonzentration und Extinktion am Schnitt ausgegangen werden konnte.

Wurden jedoch die Extinktionswerte, die sich bei der Wellenlänge λ 480 nm ergaben, über denen von λ 430 nm aufgetragen, so sank der r-Wert und es ergaben sich Zweifel, ob bei Wellenlängen über λ 460 nm die Extinktion noch eine lineare Funktion der Farbstoffkonzentration war. Die der Proteinquantifizierung dienenden Messungen an NYS-Schnitten wurden deshalb bei λ 440 nm durchgeführt.

Die r-Werte, die sich aus den DNFB-Spektren (s. Tab. 1 und Abb. 9) ergaben, waren zwar immer noch signifikant hinsichtlich einer linearen Regression ($p < 5\%$), jedoch im Vergleich zu denen der NYS-Färbung erniedrigt. Die beste Korrelation ergab sich bei Auftragung der Extinktionswerte bei λ 420 nm gegen diejenigen bei λ 400 nm. Aus diesem Grunde erfolgten die weiteren Messungen bei dieser Proteinfärbung in diesem Bereich, d.h. im Extinktionsmaximum.

Für die Färbungen mit CBB ergab sich aufgrund signifikanter Regreesionsanalyse (s. Tab. 1 und Abb. 10) ein geeigneter Wellenlängenbereich zwischen λ 620 nm und 590 nm. Die weiteren Messungen erfolgten deshalb bei λ 610 nm.

Auch die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wurde am Schnitt diesen Kriterien unterworfen, dabei wurde als geeigneter Wellenlängenbereich für die weitere Messung λ 550 bis λ 500 nm ausgewählt (s. Tab. 1 und Abb. 7).

Nach Definition des geeigneten Meßwellenbereiches konnte der erste Teil des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Extinktion als lineare Funktion der optischen Wellenlänge) an Schnitten mit unterschiedlicher Schnittdicke geprüft werden).

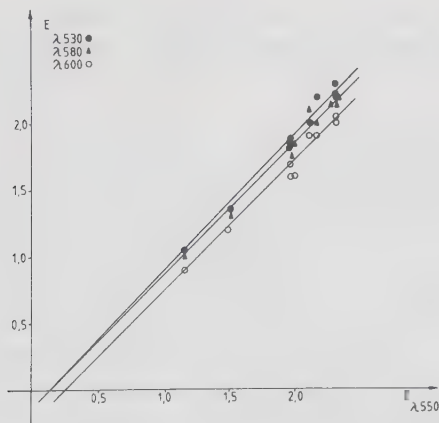


Abb. 7:

Alkalische Phosphatase-Reaktion; Regreesionsanalysen aus den "in situ"-Spektrenmessungen zum indirekten Beleg der Anwendbarkeit des Lambert-Beer-Gesetzes (Verfahren siehe Text).

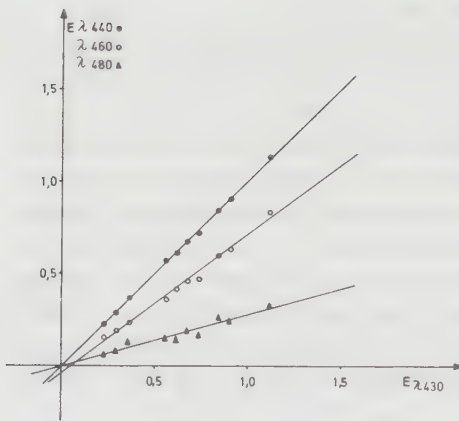


Abb. 8:

Proteinfärbung mit Naphthol-Yellow-S; Regressionsanalysen aus den "in situ"-Spektrenmessungen (vergl. Legende Abb. 7 und Text).

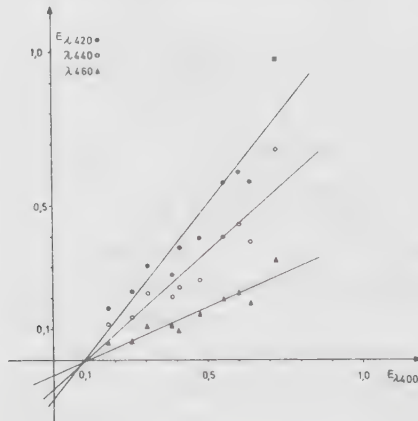


Abb. 9:

Proteinfärbung mit Dinitrofluorobenzol; Regressionsanalysen aus den "in situ"-Spektrenmessungen (vergl. Legende Abb. 7 und Text).

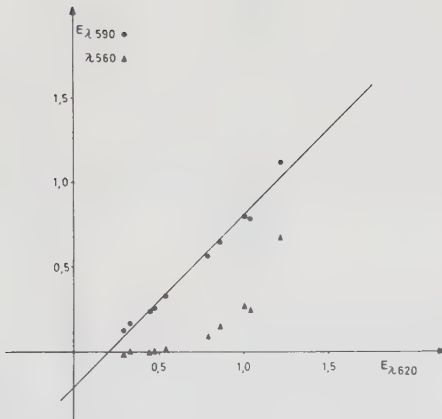


Abb. 10:

Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250; Regressionsanalysen aus den "in situ"-Spektrenmessungen (vergl. Legende Abb. 7 und Text).

Färbung	Wellenlängen			
	x - Achse	y - Achse	n	r
aP	550	530	10	0,989
	550	580	10	0,997
	550	600	10	0,992
NYS	430	440	10	1,000
	430	460	10	0,995
	430	480	10	0,961
DNFB	400	420	10	0,940
	400	440	10	0,931
	400	460	10	0,935
CBB	620	590	10	0,986

Tab. 1:

Ergebnis der Regressionsanalysen (Regressionskoeffizient = r) mit Meßwerten (x-Achse = im Extinktionsmaximum, y-Achse = außerhalb des Extinktionsmaximums) der "in situ"-Extinktionsspektren für die alkalische Phosphatase-Reaktion (aP) und die drei Proteinfärbungen (NYS, DNFB, CBB).

Die Abhängigkeit der Extinktionsmittelwerte ($\pm$ SD) des Reaktionsproduktes in situ von der Schnittdicke ist für die Proteinfärbung in Abb. 11 gezeigt. Bei neun unterschiedlichen Schnittdicken war die errechnete lineare Regression hochsignifikant ($r = 0,986$). Der Schnittpunkt mit der Y-Achse lag bei 0,103 Extinktionseinheiten, also innerhalb der Grenzen der einzelnen Standardabweichungen der Mittelwerte und somit nicht in einem signifikanten Abstand zum Ursprung.

Im Falle der DNFB-Färbung (Abb. 12) war die Extinktion ebenfalls eine lineare Funktion der Schnittdicke ($r = 0,976$), der Schnittpunkt mit der Y-Achse lag jedoch sehr hoch (0,268 Extinktionseinheiten), das bedeutet eine große Restextinktion bei "0"/ μ m Schnittdicke.

Die Regressionsanalyse, die sich aus den Extinktionswerten der CBB-Färbung ergab, zeigte, daß in diesem Fall der erste Teil des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Abhängigkeit der Extinktion vom Lichtweg entsprechend Schnittdicke) nicht erfüllt wurde (Abb. 13, $r = 0,677$, nicht signifikant, hoher Schnittpunkt mit der Y-Achse, 0,929 Extinktionseinheiten). Aus diesem Grund wurde diese Proteinfärbung nicht weiter angewendet.

Die Messungen der sehr kräftigen alkalischen Phosphatase-reaktion erfolgten (FBB-Färbung) im Falle hoher Substratkonzentration in einem Wellenlängenbereich jenseits des Maximums, um innerhalb des Linearitätsbereiches des Fotomultipliers zu bleiben.

Hinsichtlich der direkten Prüfung des Lambert-Beer-Gesetzes (Teil I: Lineare Abhängigkeit der "in situ"-Extinktion von dem Lichtweg also der Schnittdicke) ergab die Regressionsanalyse bei beiden Wellenlängen bzw. Substratkonzentrationen lineare Beziehungen zwischen Extinktion und Schnittdicke bis zu einer Schnittdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ und einer Substratkonzentration bis zu $1,5\text{ mmol}$ bei einer Inkubationszeit von 3 Minuten (Abb. 14, $\lambda\text{ }500\text{ nm}$, $r = 0,993$; $\lambda\text{ }550\text{ nm}$, $r = 0,993$). Bei Wertung der Schnittpunkte mit der Y-Achse (0,36 Extinktionseinheiten und 0,51 Extinktionseinheiten) ist zu berücksichtigen, daß diese Restextinktionen durch das Stroma bedingt sind, welches eine unspezifische Hintergrundfärbung besitzt, wenn - wie zur Aufnahme der Schnittdickenlinearität - Glas als Referenzwert benutzt wird. Für die späteren Enzymaktivitätsmessungen wurde dabei dieses Stroma selber als Referenzmeßort verwendet.

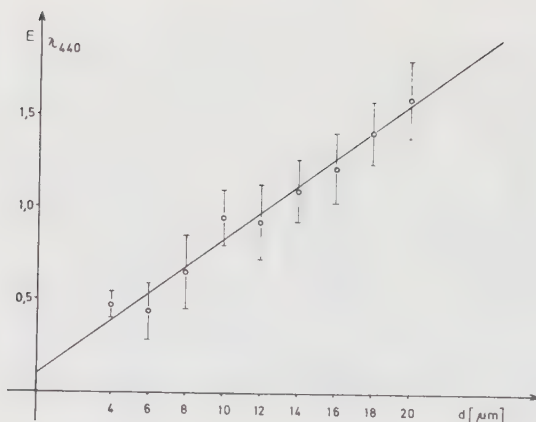


Abb. 11:

Proteinfärbung mit Naphthol-Yellow-S: Auftragung der der "in situ"-Extinktion (E) in Abhängigkeit von der Schnittdicke (d) $\pm$ SD, Ergebnis der linearen Regression als Gerade dargestellt (proportionale Abhängigkeit der Extinktion vom Lichtweg gegeben).

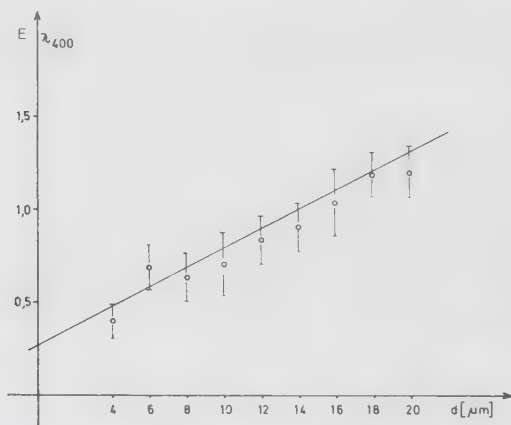


Abb. 12:

Proteinfärbung mit DNFB: Auftragung der Extinktion (E) über der Schnittdicke (d) $\pm$ SD sowie Ergebnis der linearen Regression (ideale Gerade).

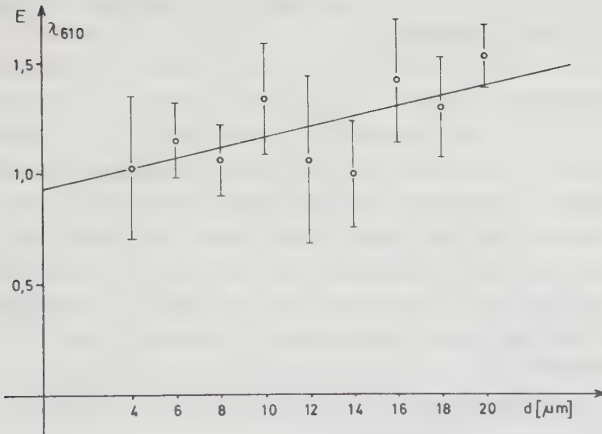


Abb. 13:

Proteinfärbung mit CBB: Auftragung der Extinktion (E) über der Schnittdicke (d) + SD sowie Ergebnis der linearen Regression (ideale Gerade).

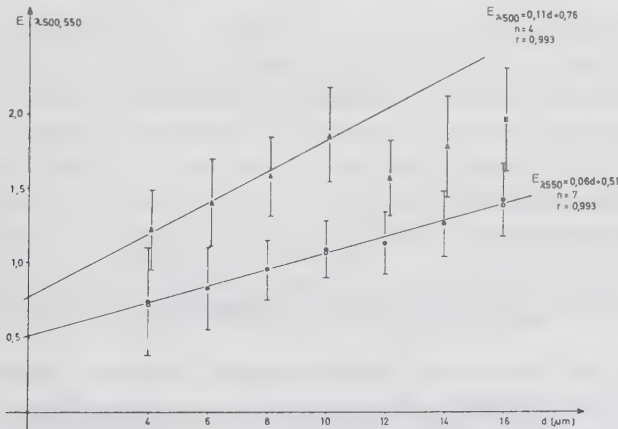


Abb. 14:

Alk.-Phosphatase-Reaktion: Auftragung der Extinktion (E) "in situ" in Abhängigkeit von der Schnittdicke (d) + SD sowie Ergebnis der linearen Regressionen (ideale Gerade) für Messungen bei λ 500 nm und Substratkonzentration 1,5 mM (▲) und Messungen bei 550 nm und Substratkonzentration 0,5 mM (●).

3.3 Kinetische "in situ"-Charakterisierung der unspezifischen alkalischen Phosphatase

3.3.1 Vorbemerkung

Die hier benutzte Methode zur "in situ"-Charakterisierung der unspezifischen alkalischen Phosphatase basiert auf der Azofarbstoffmethode von Burstone (1962) und ist technisch vergleichbar mit der von Gutschmidt et al. (1979, 1980) entwickelten Methode zur Charakterisierung der α -Glukosidase. Um die Grenzbedingungen festzulegen, innerhalb derer die Methode anwendbar ist, wurden neben den histochemischen Versuchen Enzymaktivitätsbestimmungen unter vergleichbaren Bedingungen im Homogenat durchgeführt.

3.3.2 Grenzbedingungen der Methode

3.3.2.1 Prüfung der optischen Quantifizierbarkeit

Die Festlegung der Grenzen der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes erfolgte indirekt (Nachweis geometrisch ähnlich verlaufender Extinktionsspektren durch Quotientenbildung bzw. Regressionsanalyse von Extinktionsmeßwerten außerhalb und im Extinktionsmaximum, siehe Abb. 7 und Tab. 1)) und direkt (lineare Beziehung zwischen Extinktion und Schnittdicke) wie oben ausgeführt (Abb. 14).

3.3.2.2 Prüfung von "steady-state"-Bedingungen

Die Messung der Extinktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Schnittdicke: $10\text{ }\mu\text{m}$, Substratkonzentration: 0,5 mmol und 1,5 mmol, Wellenlänge: λ 550 nm und 500 nm) ergab bei Berücksichtigung der größten Standardabweichung der individuellen Meßpunkte immer noch einen Schnittpunkt der durch lineare Regression ermittelten Geraden mit dem Ursprung. Für die höchste Substratkonzentration (1,5 mmol) endete die

Proportionalität zwischen Extinktion und Inkubationszeit jedoch bei 2,5 bis 3 Minuten (Abb. 15). Oberhalb dieses Zeitpunktes ist eine gleichartige Zunahme der Farbstoffakkumulation am Schnitt pro Zeiteinheit - also unverändert gleicher Substratumsatz pro Zeiteinheit ("steady-state") - nicht mehr gegeben.

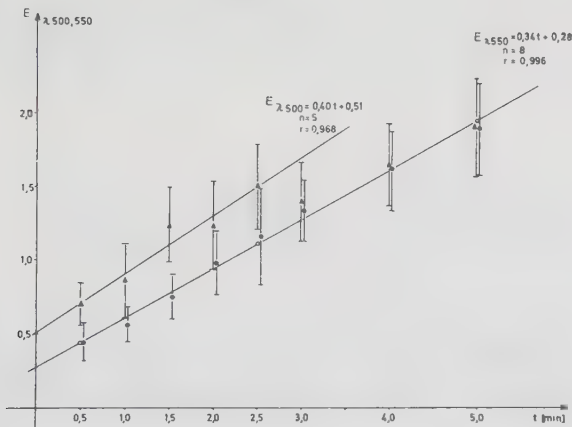


Abb. 15:

Alk.-Phosphatase-Reaktion: Auftragung der Extinktion (E) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (t) + SD, Ergebnisse der linearen Regressionen (ideale Geraden) für Messungen bei $\lambda 500$ nm und Substratkonzentration 1,5 mM (▲) und Messungen bei $\lambda 550$ nm und Substratkonzentration 0,5 mM (●).

3.3.2.3 Enzymaktivitätsbestimmungen im Homogenat

In Tab. 2 sind die apparenten K_m und V_{max} -Werte aufgeführt, die sich aus den Doppelbestimmungen im Mukosahomogenat ergaben (6 Ratten, K_m in mM, V_{max} in Extinktionseinheiten, Meßwellenlänge in der Küvette $\lambda 550$ nm).

Zwischen beiden Bestimmungsmethoden (gewichtete Regressionsanalyse und direkt linearer Plot) ergaben sich im t-Test für unverbundene Stichproben weder für K_m noch für V_{max} signifikante Unterschiede ($t_{K_m} = -0,466$, $t_{V_{max}} = -0,016$). Die steigenden Extinktionswerte bei steigender Substratkonzentration genügten bei parametrischer (gewichtete Regressionsanalyse) und nichtparametrischer (direkt linearer Plot) Analyse einer Sättigungskinetik (Abb. 16): Die mit den Daten beider Verfahren errechneten idealen Sättigungskurven für die Substrathydrolyse im Homogenat befinden sich in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, wie das Beispiel von Ratte Nr. 6 zeigt (Abb. 16).

Nr.	gew. Regressionsanalyse $\pm$ SD		Dir. lin. Plot	
	K_m (mM)	V_{max} (E)	K_m (mM)	V_{max} (E)
1	0,138 $\pm$ 0,0001	0,724 $\pm$ 0,0002	0,26	0,76
2	0,359 $\pm$ 0,0013	1,183 $\pm$ 0,0020	0,17	0,92
3	0,283 $\pm$ 0,0002	1,046 $\pm$ 0,0002	0,33	1,08
4	0,204 $\pm$ 0,00002	1,050 $\pm$ 0,0002	0,28	1,16
5	0,325 $\pm$ 0,0121	1,148 $\pm$ 0,0201	0,41	1,22
6	0,234 $\pm$ 0,0002	0,970 $\pm$ 0,0002	0,22	0,99
	$\bar{K}_m = 0,257 \pm 0,0814$	$\bar{V}_{max} = 1,020 \pm 0,1641$	$\bar{K}_m = 0,278 \pm 0,0842$	$\bar{V}_{max} = 1,022 \pm 0,1683$

Tab. 2:

Alk. Phosphatase, Untersuchung im Homogenat mit dem "histochemischen" Substrat, Ermittlung apparenter kinetischer Konstanten.

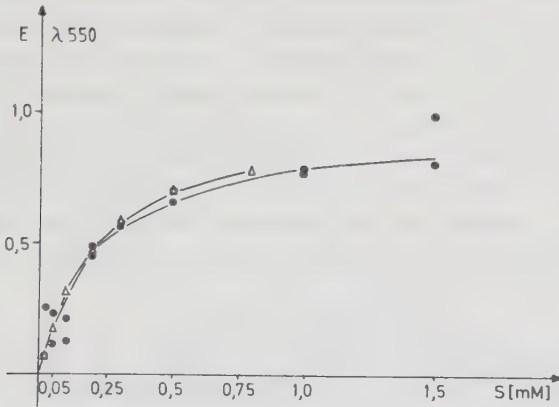


Abb. 16:

Alk. Phosphatase, Bestimmung im Homogenat: Ideale Kurven, die sich aus den in Tab. 2 berechneten kinetischen Daten ergeben (gewichtete Regressionsanalyse : ●-● ; direkt linearer Plot : Δ-Δ) im direkten Vergleich mit den experimentellen Daten.

Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit (Ordinate), ausgedrückt in Extinktionseinheiten (ermittelt bei λ 550 nm mit einem PQ 20 Zeiss - Spektrophotometer und Küvetten mit 1 cm optischer Wellenlänge), über den Substratkonzentrationen (Abszisse).

3.3.2.4 Zusammenfassung

Nach Vorwahl der Grenzbedingungen für die optische Quantifizierung am Schnitt (Spektrencharakterisierung, Bestimmung von Schnittdicke ($10/\mu\text{m}$), Inkubationszeit (3 Minuten)) und Definition des Substratkonzentrationsbereiches im Homogenat (bis 1,5 mmol), innerhalb dessen eine Sättigungskinetik der Substrathydrolyse zu erwarten ist, erfolgte die kinetische "in situ"-Charakterisierung der alkalischen Phosphatase im Gewebsschnitt. Dabei wurden zwei verschiedene Meßtechniken eingesetzt, das kontinuierliche zweidimensionale "Scannen" und die "Pfahlmessungen".

3.3.3 Anwendung

3.3.3.1 Kontinuierliches zweidimensionales "Scannen"

Hierdurch sollte die augenscheinlich unterschiedliche Farbstoffakkumulation in der Bürstensaumregion während der Enterozytenreifung, wie an der Verteilung des farbigen Reaktionsproduktes entlang der Zotte in Abb. 1 erkennbar, quantifiziert werden, um dann die repräsentativen Meßorte für die späteren "Pfahlmessungen" festzulegen.

Die Methode des kontinuierlichen "Scannens", d.h. des kammförmigen Abfahrens des gesamten Farbstoffniederschlages von apikal nach basal entlang der Zotte ist sehr zeitaufwendig, so daß nur zwei Zottenseiten "gescannt" wurden. Im Vergleich zur Erfassung der Farbstoffverteilung durch "Pfahlmessungen" wird etwa 120mal so viel Zeit benötigt.

Nach Multiplikation von farbstoffbedeckter Fläche und jeweiliger mittlerer Extinktion pro Flächeneinheit zeigte sich, daß sich der Ort größter Enzymaktivität am Übergang vom mittleren zum oberen Zottendrittel befindet (Abb. 17). Das genannte Produkt entspricht dem in dieser Region vom Enzym produzierten Farbstoff, welcher nach Beachtung der Grenzbedingungen (s.o.) der Enzymaktivität proportional gesetzt werden kann. Die mit

Hilfe dieses Verfahrens erfolgte Definition von Orten minimaler und maximaler Enzymaktivität entlang des Resorptionsepithels der Zotte stellt die Voraussetzung dar für den Einsatz von "Pfahlmessungen" an definierten Zottenorten z.B. "apikal", dem Ort maximaler und "basal", dem Ort minimaler Aktivität.

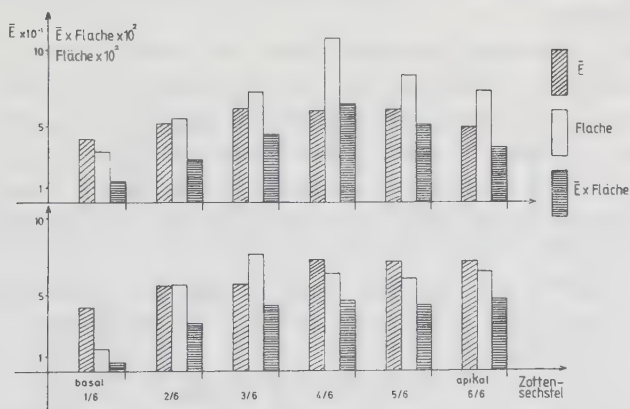


Abb. 17:

Extinktionsmessungen bei "kontinuierlichem zweidimensionalem Scannen" der jeweils linken Seite zweier unterschiedlicher Zotten (0,5 mM Naphthol-AS-BI-Phosphat, 1 mg/ml Fast Blue B, 3 min Inkubationszeit, Schnittdicke 10/ μ m).

E entspricht der mittleren Extinktion pro Zotten-sechstel und Meßfeld (), "Fläche" entspricht der mit Farbstoff bedeckten Fläche () und $E \times \text{Fläche}$ () entspricht dem Produkt beider.

Die absoluten Werte erhält man, indem man die Werte der y-Achse mit 10^{-1} (E) bzw. 10^2 (Fläche, E x Fläche) multipliziert.

3.3.3.2 "Pfahlmessungen"

In Tab. 3 sind, für jedes Versuchstier getrennt, die apparenten kinetischen Daten aufgeführt, die sich bei "Pfahlmessungen" am Ort der größten Enzymaktivität (apikale Zottenposition) ergaben.

Die durch gewichtete Regressionsanalyse ermittelten Standardabweichungen der apparenten K_m und V_{max} -Werte sind zwar größer als die der Bestimmungen im Homogenat, der t-Test zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede der K_m ($t = -0,222$) und V_{max} ($t = -0,040$)-Werte zwischen den beiden Berechnungsmethoden (gewichtete Regressionsanalyse-wra- und direkt linearer Plot-dlp-).

An der Zottenbasis ("basaler" Ort) wurden fast identische K_m -Werte errechnet, wohingegen die V_{max} -Werte kleiner waren (vergl. Tab. 4).

Eine zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigt diesen V_{max} -Gradienten entlang der Zotte auf dem 5%-Niveau sowie die Identität der K_m -Werte an beiden Zottenorten (vergl. Tab. 5).

Der Verlauf der aus den "in situ" apparenten kinetischen Daten berechneten idealen Sättigungskinetiken im Vergleich zu den experimentellen Daten ist am Beispiel von Versuchstier Nr. 5 in Abb. 18 dargestellt. Die am apikalen Zottenort gemessenen Werte waren deutlich größer als die des basalen Zottenortes. Eine gute Konformität zeigte sich im oberen und unteren Drittel der Kurve, wohingegen die Extinktionswerte bei der Substratkonzentration 0,5 mmol von der idealen Kurve abwichen. In diesem teilweise abgeflacht ansteigenden Schenkel der Sättigungskurve standen jedoch nicht genügend Substratkonzentrationspunkte zur Verfügung, so daß eine weitergehende mathematische Analyse nicht möglich war.

Der asymptotische Teil der Kurven (Substratkonzentration größer als 1,5 mmol) lag außerhalb des vorher festgelegten Grenzbereiches der Quantifizierbarkeit der Farbreaktion am Schnitt und konnte deswegen experimentell nicht erfaßt werden. Da die Art der Kurvenanalyse (parametrisch oder nichtparametrisch) keinen Einfluß auf die Größe der K_m - und V_{max} -Werte ausübte (kein Effekt des Faktors "Plot", s. Tab. 5), ist es unwahrscheinlich, daß etwaige andere Orte der Katalyse am Enzym mit differenten K_m -Werten aus rein methodischen Gründen der Datenanalyse übersehen wurden.

Nr.	gew. Regressionsanalyse $\pm$ SD		Dir. lin. Plot	
	K_m (mM)	V_{max} (E)	K_m (mM)	V_{max} (E)
1	0,334 $\pm$ 0,0192	2,568 $\pm$ 0,0675	0,62	3,30
2	1,124 $\pm$ 0,0785	4,820 $\pm$ 0,2213	1,16	4,58
3	1,538 $\pm$ 0,1626	5,974 $\pm$ 0,4406	1,56	6,18
4	0,613 $\pm$ 0,0262	3,352 $\pm$ 0,1353	0,71	3,24
5	0,595 $\pm$ 0,0501	3,273 $\pm$ 0,1353	0,48	3,06
6	0,677 $\pm$ 0,0505	3,767 $\pm$ 0,1173	0,66	3,76
	$\bar{K}_m=0,814 \pm 0,4377$	$\bar{V}_{max}=3,992 \pm 1,2168$	$\bar{K}_m=0,868 \pm 0,4177$	$\bar{V}_{max}=4,02 \pm 1,1912$

Tab. 3:

Alk.-Phosphatase-Reaktion, unfixierte Kryostatschnitte.
apparente kinetische Daten "in situ", apikale Zottenposition.

Nr.	gew. Regressionsanalyse $\pm$ SD		Dir. lin. Plot	
	K_m mM	V_{max} ()	K_m mM	V_{max} ()
	$0,448 \pm 0,0329$	$2,245 \pm 0,0818$	0,76	2,87
2	$0,916 \pm 0,0798$	$3,634 \pm 0,2100$	0,72	2,98
1	$1,044 \pm 0,1203$	$3,990 \pm 0,3019$	0,92	3,63
4	$0,915 \pm 0,0879$	$3,608 \pm 0,1626$	0,88	3,10
5	$0,552 \pm 0,0556$	$2,473 \pm 0,1366$	0,44	2,17
6	$1,070 \pm 0,1242$	$3,631 \pm 0,2747$	0,92	3,49
$\bar{K}_m = 0,824 \pm 0,2612$ $\bar{V}_{max} = 3,264 \pm 0,7185$ $\bar{K}_m = 0,770 \pm 0,184$ $\bar{V}_{max} = 3,040 \pm 0,5184$				

Tab. 4:

Alk.-Phosphatasen-Reaktion, unfixierte Kryostatschnitte, apparente kinetische Daten "in situ", basale Zottenposition.

Effekt	FG	V_{max}		K_m	
		ssq	msq	ssq	msq
Total	23	22,955		2,3701	
Position	1	4,3802	4,3802*	0,0115	0,0115
Plot	1	0,0576	0,0576	0,0000	0,0000
Plot x Position	1	0,0945	0,0945	0,0178	0,1521
Fehler	20	18,4227	0,9211	2,3408	0,1170

* $p < 0,05$

Tab. 5:

Zweifaktorielle Varianzanalyse: Einfluß von Zottenort (= basale und apikale Position) sowie Auswertungsmodus (= direkt linearer Plot bzw. gewichtete Regressionsanalyse) auf die apparenten kinetischen "in situ" Konstanten (V_{max} , K_m) der alk. Phosphatase.

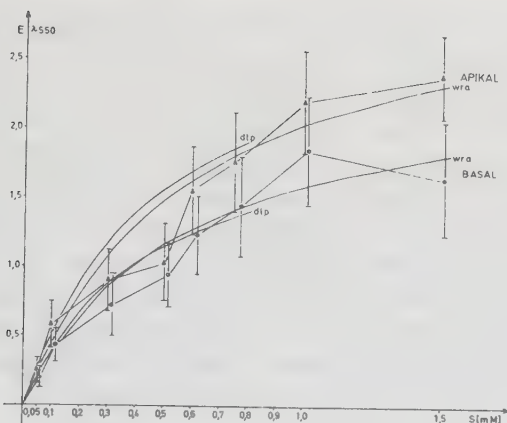


Abb. 18:

"Pfahlmessungen", Ratte Nr. 5:

Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit ausgedrückt in Extinktionseinheiten (E) bei λ 550 nm über der Substratkonzentration (S).

Die Hydrolyse des Substrats (Naphthol-AS-BI-Phosphat) am Schnitt, an zwei unterschiedlichen Zottenorten (apikal und basal) wird hier dargestellt als direkter Vergleich der theoretischen Kurven (errechnet aus den in Tab. 3 und Tab. 4 angegebenen kinetischen Konstanten; wra = gewichtete Regressionsanalyse; dip = direkt linearer Plot) mit den experimentell ermittelten Werten (—●— bzw. —▲— + SD).

3.3.3.3 Querprofilmessungen

Der Frage, ob die Technik der Querprofilmessungen eine geeignetere Bestimmungsmethode von apparenten "in situ" kinetischen Konstanten darstellt, als der Einsatz von Pfahlmessungen, wurde am Beispiel von Versuchstier Nr. 5 nachgegangen. Die größere Genauigkeit der Farbstoff Erfassung auf dem Niveau der einzelnen Zotte wurde leider durch eine größere Varianz der Meßwerte im aufsteigenden Schenkel der Sättigungskurve erkauft (Abb. 19 zeigt das Ergebnis der kinetischen Analyse auf dem Boden der Daten aus Querprofilmessungen). Dementsprechend

zeigen die apparenten kinetischen Konstanten große Variationsbreiten: Nach gewichteter Regressionsanalyse K_m -Wert 2,83 mM, d.h. mehr als doppelt so groß wie aus dem direkten linearen Plot (1,34 mM). Auch die apparenten V_{max} -Werte unterschieden sich deutlich voneinander: gewichtete Regressionsanalyse 11,62 Extinktionseinheiten, direkt linearer Plot 7,0 Extinktionseinheiten. Gemessen an diesen Ergebnissen führen die aufwendigeren "Querprofilmessungen" gegenüber den "Pfahlmessungen" nicht zu einer verbesserten "in situ" kinetischen Charakterisierung der alkalischen Phosphatase, so daß zur Bestimmung der kinetischen Daten im Normalkollektiv weiterhin Pfahlmessungen durchgeführt wurden.

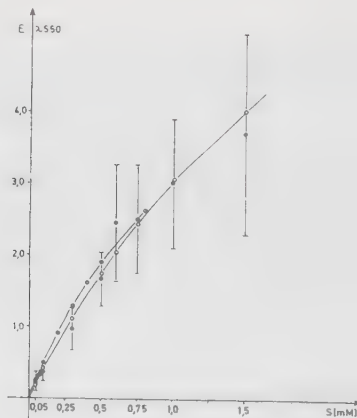


Abb. 19:

Querprofilmessungen, Ratte Nr. 5, apikale Zottenposition: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt in arbiträren Extinktionseinheiten abgeleitet aus den summierten Extinktionen pro Zotte (E) bei λ 550 nm, über der Substratkonzentration (S).

Die beiden theoretischen Kurven wurden anhand der durch direkt linearen Plot (-O- , $K_m = 1,34$, $V_{max} = 7,0$) und gewichteter Regressionsanalyse (-●- , $K_m = 2,83$, $V_{max} = 11,62$) ermittelten kinetischen Konstanten berechnet.

3.4 Querprofilmessungen am einzelnen Enterozyten

Durchfährt der Meßstrahl vom Lumen her kommend den Enterozyten senkrecht zur Zottenachse, so ergibt sich ein Extinktionsprofil entsprechend der Farbstoffverteilung.

Am Beispiel der NYS-Färbung (Abb. 20) ist die Ableitung des Begriffs "summierte Extinktionswerte" erklärt, der dazu dienen soll, ein Maß für die in der Bürstensaumregion abgelagerte Farbstoffmenge zu liefern. Hierbei wurde, um ein Profil des Proteingehaltes im gesamten Enterozyten zu erhalten (durchgehende Linie) als Referenzwert Zottenstroma (Transmission, $T = 65$) genommen und die Extinktion bei λ 440 nm über dem Enterozytenort (angegeben in Anzahl der Meßschritte bzw.

μm) aufgetragen.

Zur Erfassung des Proteingehaltes in der Bürstensaumregion (gestrichelte Linie) wurde als Referenzwert apikales Zytoplasma gleich unterhalb der Bürstensaumregion genommen ($T = 35$). Als Leerwert diente beide Male die im Lumen gemessene Transmission (Glas und Einbettungsmedium, $T = 105$).

Die Abbildung zeigt eine klare Begrenzung der gefärbten Bürstensaumregion gegenüber dem Lumen, und zur Bestimmung der Grenze zum apikalen Zytoplasma wurde als Bedingung ein Unterschied von mindestens 0,03 Extinktionseinheiten zwischen zwei aufeinanderfolgenden Meßschritten festgelegt.

Es verbleiben dadurch vier Extinktionswerte zwischen Lumen und apikalem Zytoplasma, die zur Errechnung des dann endgültigen Extinktionswertes aufsummiert und durch die Länge des Meßfeldes (jeweils $4\mu\text{m}$) dividiert werden.

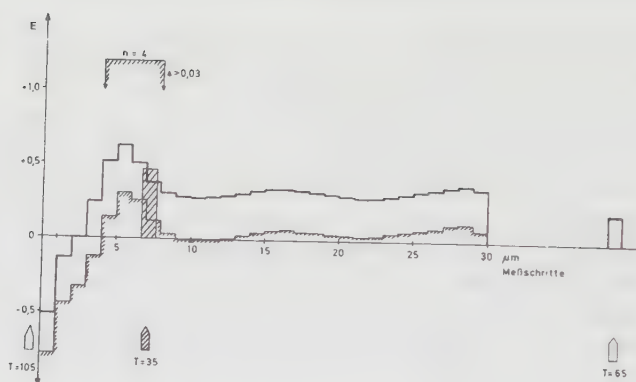


Abb. 20:

NYS, basale Zottenposition (Pos. 6).
Querprofilmessungen zur Ermittlung "endgültiger Extinktionswerte".

x - Achse: Anzahl der Meßschritte (μm) die notwendig waren, um vom Lumen her die Bürstensaumregion bis zum Zytoplasma zu durchfahren.

y - Achse: Die den jeweiligen Meßschritten entsprechenden Extinktionswerte (E) bei λ 440 nm.

3.5. Messungen der Enzymaktivität und des Proteingehaltes an sechs verschiedenen Zottenorten

Für alle histochemischen Reaktionen ergaben sich bei Anwendung des Kruskal-Wallis-Testes, an den sechs verschiedenen Zottenorten, signifikante Unterschiede zwischen den durch Querprofilmessungen ermittelten "summierten Extinktionswerten" (Tab. 6).

Die Maxima der Mediane der "summierten Extinktionswerte" lagen für die unspezifische alkalische Phosphatase, die neutrale α -Glukosidase, die Laktase/ β -Glukosidase, sowie NYS und DNFB an der Zottenposition Nr. 3 (Tab. 6). Für die Dipeptidylpeptidase IV lag das Maximum an der apikalen Zottenposition Nr. 1.

Für keine der histochemischen Reaktionen ergab der multiple Vergleich der Extinktionswerte in bezug auf die Meßorte irgendeinen statistischen Anhalt für Unterschiede in den Extinktionen an den Positionen 1 bis 4.

Obwohl die Extinktionswerte der Position 1 bis 4 sich nicht signifikant voneinander unterschieden, rangierten sie signifikant höher als die in Position 5 und 6 gemessenen Werte.

In den meisten Fällen ergaben sich für die Enzym- und Proteinfärbungen die gleichen signifikanten Unterschiede, besonders beim Vergleich zwischen Zottenposition 1 und 6 sowie 3 und 6. Es ließ sich also der Schluß ziehen, daß sowohl Protein- als auch Enzymaktivität ihr Maximum in der oberen Zottenhälfte haben.

Bei den Medianen der Anzahl der Meßschritte, die notwendig waren, um bei der Querprofilmessung den Farbstoffniederschlag vollständig zu erfassen, ergaben sich die in Tab. 7 aufgeführten Werte. Für alle Färbungen (mit Ausnahme der DPP IV) lagen die höchsten Werte in der mittleren Zottenposition. Ein multipler Vergleich zwischen den einzelnen Färbungen (Tab. 8) ergab für die α -Glukosidase den am schärfsten lokalisierten Farbstoffniederschlag. Der schmalste Farbstoffsaum wurde an der Zottenbasis (Position 5 und 6, Tab. 8) gemessen. Die Verläufe der Extinktionswerte und der Breiten des Farbstoffniederschlages entlang der Zotte waren also prinzipiell gleichartig. Dabei zeigte ein Vergleich der Zahlenwerte, daß die Maximalwerte der Farbstoffakkumulation im Bereich der oberen Zottenhälfte überwiegend durch die Extinktionswerte (Tab. 6) und nicht nur durch die Zunahme der farbstoffbedeckten Flächen (Tab. 7) bedingt waren.

Zotten- position		NYS	DNFB	Δ - Gluk.	α - Gluk.	aP	DPP IV
apikal	1	0,26	0,13	0,23	1,07	1,98	2,29
	2	0,25	0,09	0,30	1,36	2,12	1,21
	3	0,35	0,17	0,35	2,27	3,49	1,61
	4	0,24	0,13	0,12	1,11	1,80	1,38
	5	0,09	0,09	0,05	0,46	0,80	0,83
basal	6	0,04	0,03	0,02	0,23	0,49	0,36
H - Wert		26,8*	19,2*	39,1*	31,1*	37,6*	31,1*

Tab. 6:

Querprofilmessungen, Mediane der "summierten Extinktionswerte" an den sechs verschiedenen Zottenpositionen für zwei Protein- und vier Enzymfärbungen.

Einwegvarianzanalyse der für jede Färbung ermittelten Werte. Die entsprechenden H-Werte (Kruskal-Wallis-Test) sind in der letzten Zeile aufgeführt (* = $p < 1\%$).

Zotten- position		NYS	DNFB	B - Gluk.	α - Gluk.	AP	DPP IV
apikal	1	7,0	8,0	9,0	15,5	9,5	14,0
	2	7,0	6,0	9,5	16,5	9,5	9,5
	3	8,0	8,0	12,0	20,5	13,5	12,0
	4	7,0	8,0	6,5	16,0	10,0	10,5
	5	4,0	6,0	4,0	12,5	8,5	9,5
basal	6	3,0	3,0	3,5	9,0	7,5	8,0

Färbung: K = 24,83 $p < 1\%$

Zottenposition: K = 23,64 $p < 1\%$

Tab. 7:

Querprofilmessungen, Mediane der zur vollständigen Erfassung des Farbstoffniederschlages notwendigen Meßschritte (1/ μ m), an den sechs verschiedenen Zottenpositionen für zwei Protein- und vier Enzymfärbungen.

Zweiwegvarianzanalyse der für jede Färbung ermittelten Werte. Die entsprechenden K-Werte (Friedman-Rank-Test) sind unter der Tabelle angegeben.

Färbung

	DPP IV	g - Gluk.	w - Gluk.	MTS	DNPU
"	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DPP IV		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
g - Gluk.			n.s.	n.s.	n.s.
w - Gluk.				n.s.	n.s.
MTS					n.s.

Zottenposition

	2	3	4	5	6 basal
apikal	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2		n.s.	n.s.	n.s.
	3			n.s.	n.s.
	4				n.s.
	5				n.s.

Tab. 8:

Querprofilmessungen, multipler Vergleich der Anzahl der Meßschritte nach Wilcoxon und Wilcox (* = $p < 5\%$, ** = $p < 1\%$, n.s. = nicht signifikant).

Der obere Teil der Tabelle bezieht sich auf die verschiedenen Färbungen, der untere Teil auf die verschiedenen Zottenpositionen.

4. Diskussion

Das erste Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit besteht in der Erarbeitung eines Weges zur "in situ" - d.h. im Gewebeschnitt - Charakterisierung und Quantifizierung der unspezifischen alkalischen Phosphatase in der Bürstensaumregion des intestinalen Resorptionsepithels. Dabei kam für den bekannten Nachweis des Enzymes mittels einer Azokupplungsmethode (Burstone 1962) das optische, mikrodensitometrische Verfahren zur Anwendung, welches sich bereits für Disaccharidasen (Gutschmidt et al. 1979, 1980; Gutschmidt 1981) und Membranproteasen (Gutschmidt und Gossrau 1981) als anwendbar erwiesen hatte. Im Verlauf der einzelnen methodischen Schritte auf dem Wege zu diesem Ergebnis, insbesondere der spektrophotometrischen Beschreibung des farbigen Reaktionsproduktes im Gewebe und der Erfassung seiner Entstehung in bezug zu den kinetischen Charakteristika der verantwortlichen Enzymaktivität werden sowohl Unterschiede wie Gemeinsamkeiten zu den bereits erfaßten Bürstensaumenzymen als auch die Grenzen des Verfahrens deutlich. Diese Gesichtspunkte sollen im methodischen Teil, der Diskussion gesondert angesprochen werden.

Die biologische Relevanz einer "in situ"-Charakterisierung und -Quantifizierung der alkalischen Phosphatase ist in der Tatsache begründet, daß mit diesem Verfahren die Möglichkeit gegeben ist, die Aktivität und die Affinität dieses Enzymes zu seinem künstlichen Substrat in verschiedenen Organen an geringen Gewebemengen (z.B. Biopsien) in direktem Bezug zur Histologie definieren zu können. Als Organe kommen hierbei - wie einleitend ausgeführt - neben dem gesamten Intestinaltrakt auch das Tubulussystem der Niere und die Leber in Betracht. Möglicherweise gelingt es, mit diesem neuen methodischen Ansatz in tierexperimentellen und bioptischen Untersuchungen unter definierten physiologischen Bedingungen zur näheren Beschreibung der bislang - trotz vielfältiger Bemühungen -

noch nicht hinreichend geklärten Bedeutung dieses Enzymes beizutragen.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß mit der Aktivität der "unspezifischen alkalischen Phosphatase" eine Summe von katalytisch aktiven Proteinen erfaßt wird, deren Differenzierung, wie kürzlich am Rattenjejenum gezeigt, auch topographisch innerhalb des Gewebes erforderlich ist (Chan und Atkins 1983). Ein Vergleich unserer "in situ"-Enzymbestimmungen mit jenen Daten aus Enterozytenzellsuspensionen zeigt übereinstimmend den ansteigenden baso-apikalen Aktivitätsgradienten der alkalischen Phosphatase entlang der Zotte. Unsere am Schnitt auf der Zotte ermittelten apparenten K_m -Werte gegenüber Naphthol-AS-BI-Phosphat (0,77-0,87 mM) stimmen mit den Daten dieser Autoren für Paranitrophenylphosphat in der Krypte (0,67 mM) überein. Eine Affinitätssteigerung auf der Zotte konnten wir in situ nicht ermitteln. Im Homogenat liegen unsere apparenten K_m -Werte für Naphthol-AS-BI-Phosphat in der gleichen Größenordnung (0,25-0,28 mM) wie von Chan und Atkins mit Paranitrophenylphosphat an Homogenaten der Enterozytenzellsuspensionen beschrieben (0,25 mM). Obwohl bei einem solchen Vergleich die Substratunterschiede zu berücksichtigen sind - wie ein Vergleich der verschiedenen K_m -Werte (siehe Tabelle 9) zeigt - belegt er doch, daß unsere Biochemie am Gewebsschnitt mit vergleichbarer Genauigkeit kinetische Charakteristika zu beschreiben in der Lage ist.

Enzympräparierungen	Substrat	pH	K _m (mM)	Literatur
gereinigtes Enzym A, B, C	p-Nitro-phenyl-Phosphat	10,5	2,8	Nakasaki et al. (1979)
gereinigtes Enzym	p-Nitro-phenyl-Phosphat	9,0	5,0	Righetti und Kaplan (1971)
gereinigtes Enzym (drei Isoenzyme)	β-Glycero-Phosphat	8,88	2,27	Saini und Done (1972)
Homogenat	Naphthol-AS-BI-Phosphat	8,3	0,25-0,28	diese Arbeit
Gewebeschnitt a) apikaler Zottenabschnitt	Naphthol-AS-BI-Phosphat	8,3	0,82-0,87	diese Arbeit
b) basaler Zottenabschnitt		8,3	0,82-0,77	

Tab. 9:

Michaelis-Menten-Konstanten für die alkalische Phosphatase des Rattendünndarmes. Zusammenstellung von Ergebnissen aus der Literatur mit verschiedenen Substraten im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Es wird also belegt, daß die Stärke der zytochemischen Methode am Schnitt, nämlich zusätzlich die "morphologische Spezifität" - gemeint ist die differente Lokalisationstopographie einzelner katalytischer Orte in bezug zur Gewebetextur erfassen zu können - nicht mit Nachteilen in der Beschreibung der "biochemischen Spezifität" (Beschreibung apparenter kinetischer

Konstanten) erkaufte wird. Im Gegenteil, diese Parameter können auf definierte Reaktionsorte im Gewebe, dessen Textur für herkömmliche biochemische Studien im Reagenzglas erst zerstört werden mußte, bezogen werden.

Betrachtet man den Aktivitätsgradienten der Bürstensaumenzyme entlang der Zottenkryptenachse (Nordström et al. 1968; Nordström und Dahlquist 1973; Boyle et al. 1980; Gutschmidt et al. 1980; Gutschmidt 1981), so wird der Vorteil, unterschiedliche Aktivitäts- und Affinitätsmuster von Enzymen direkt im Gewebe erfassen zu können, deutlich: Zwischen den noch nicht völlig ausgereiften Resorptionszellen der basalen Zottenregion und den funktionell kompetenten Enterozyten der oberen Zottenabschnitte entsteht ein Enzymaktivitätsunterschied in der Bürstensaummembran, welcher von Affinitätsgradienten der Bürstensaumenzyme gegenüber ihren Substraten begleitet sein kann.

Die in der Einleitung aufgeworfene Frage, ob jene Steigerung der Bürstensaumenzymaktivität von basal nach apikal entlang der Zotte durch eine Zunahme der Enzymmoleküle allein oder zusätzlich durch eine Affinitätssteigerung gegenüber dem Substrat, z.B. durch qualitative Änderung am katalytischen Ort erreicht wird, läßt sich nun mit unserer neuen Methode beantworten. Doch zunächst zu den Argumenten aus der Literatur: elektronenoptische Befunde belegen während der Enterozytenreifung entlang der Villusachse eine quantitative Zunahme der Mikrovillusoberfläche (Brown 1962) und zusätzlich eine Steigerung der Anzahl der sogenannten "intramembrane particles" (als Äquivalente für Enzymmoleküle, Madara et al. 1980); zwei Befunde, die für eine baso-apikale Zunahme der Enzymmoleküle sprechen. Unsere Daten zeigen darüber hinaus - und dies ist das zweite Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit - daß die "in situ" quantifizierte Proteinmenge in der Bürstensaumregion dem baso-apikal ansteigenden Aktivitätsgradienten der "in situ" quantifizierten Bürstensaumenzyme parallel läuft, aber deren "in situ" K_m nicht verändert (für alkalische Phosphatase

vergl. diese Arbeit, für Disaccharidasen siehe Gutschmidt 1981). Auf diese Weise konnte ein weiteres Argument dafür erbracht werden, daß der Überwiegende Anteil der Enzymaktivitätssteigerung in der Bürstensaummembran während der Enterozytenreifung auf einer Zunahme von Enzymmolekülen und nicht auf einer Affinitätsveränderung beruht.

Die Trennung dieser beiden Qualitäten ist deswegen von Bedeutung, da sich im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen zur intestinalen Adaptation gezeigt hat, daß sowohl bei gleichem wie auch bei unterschiedlichem morphologischen Umformungstyp der Mukosaarchitektur Enzymaktivität und Substrataffinität der Disaccharidasen sowohl gleichsinnig als auch gegensinnig verändert sein können (Gutschmidt et al. 1982c). Die Kenntnis solcher Reaktionsmuster unter definierten Stimulie wie proximaler Resektion (Gutschmidt et al. 1983b), Anlage einer selbstfüllenden oder selbstentleerenden Blindschlinge (Gutschmidt et al. 1982b, 1982a) ist einerseits für die Interpretation bioptisch erfaßbarer Mukosaveränderungen und ihrer "in situ"-Enzymaktivitätsmuster von Bedeutung, andererseits beleuchtet sie die Unschärfe des Begriffs "Reife des Enterozyten". Im Laufe der endgültigen Enterozytenreifung während der Wanderung auf der Zotte können sich nämlich Partialfunktionen sehr unterschiedlich verändern. Dies gilt nicht nur für die oben erwähnten Bürstensaumenzyme, sondern auch für andere Funktionsparametern der Resorptionszellen, wie z.B. Fettresorption (Gangl et al. 1976), Ausprägung des Calcium-bindenden Proteins (Marche et al. 1980), Immunglobulinbindung- und -sekretion (Rodewald 1980) oder Aminosäuretransport (Menge et al. 1983). Daher kann eine einzelne Funktionsgröße, wie z.B. die Disaccharidasenaktivität der Bürstensaummembran nicht als Reifeindikator verwendet werden. Vielmehr scheint es in diesem Zusammenhang unerlässlich, in topographisch getreuer Zuordnung zur Gewebetextur möglichst viele Veränderungen des Gesamtusters von Funktionsparametern entlang der Zotte im Resorptionsepithel zu erfassen; so auch den möglichen Wandel im

Proteingehalt über definierten Bezirken des Epithels bzw. der Enterozyten. Dazu liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein methodisches Werkzeug.

Das dargelegte Verfahren einer Quantifizierung in bezug auf die histologische Gewebetextur ist prinzipiell auch auf andere Organe als den Darm anwendbar. Dabei sind zweierlei Einschränkungen zu berücksichtigen: Aufgrund der "Organspezifität" der Eiweißzusammensetzung muß für jedes Gewebe erneut geprüft werden, welches der bislang zur Verfügung stehenden (- d.h. in Modellversuchen geprüften (Tas et al. 1980) -) zytophotometrischen Verfahren zur Proteinquantifizierung die in dieser Arbeit angewandten Prüfkriterien erfüllt. Zu berücksichtigen ist bei einem solchen Vorgehen, daß jeder Proteinnachweis nur eine bestimmte Gruppe von Aminosäureresten erfaßt (Tas et al. 1980), ohne für diese spezifisch zu sein. Wir haben also einen hinsichtlich des Eiweißgehaltes lediglich globalen und unspezifischen Parameter vor uns, dessen Nutzen erst bei der "in situ"-Messung durch den direkten Bezug zu Gewebe und Zelltextur einsehbar wird, denn es wird eine Zerstörung der Gewebestruktur vermieden, was z.B. bei einer Untersuchung im Rahmen präparativ biochemischer Verfahren zu Veränderungen von Proteinqualitäten entlang der Villuskryptachse unumgänglich ist (Simon et al. 1975).

Durch Anwendung verfeinerter Meßverfahren - wie z.B. in unserem Fall der Querprofilmessung mit Erstellung von Längsschnitten des Proteingehaltes durch den Enterozyten - eröffnen sich außerdem Perspektiven zur differentiellen Erfassung des Proteingehaltes innerhalb anderer subzellulärer Kompartimente außerhalb der Bürstensaummembran, eine Anwendung, die allerdings für die klinische Routinebiopsiediagnostik nicht relevant sein dürfte.

Die beiden wesentlichen methodischen Probleme und damit die Grenzen der Anwendbarkeit einer zytophotometrischen "in

situ"-Quantifizierung von farbigen Reaktionsprodukten betreffen den Nachweis von Enzymen, hier die alkalische Phosphatase, und Proteinen in gleicher Weise: Es sind dies

1. die Verfahren der direkten und indirekten Überprüfung der Gültigkeit des Lambert-Beer-Gesetzes (Ewing und Maschka 1964) für das farbige Reaktionsprodukt am Schnitt und
2. die Auswahl des zytophotometrischen Meßverfahrens zu seiner Quantifizierung.

Betrachten wir zunächst das Meßverfahren: Bildet das zu messende Objekt eine zusammenhängende Fläche, welche in einer Richtung ausgedehnt ist, und tritt dieses Objekt innerhalb des Gesichtsfeldes in gleichartiger Weise wiederholt auf - wie im Fall des Reaktionsproduktes der Bürstensaumenzyme entlang der Zotten - so kann mit Recht bei relativ geringer Speicherkapazität in kammförmigen Meßbewegungen eine beliebige - z.B. nach Zufallszahlen ausgewählte - Anzahl dieser Objekte abgefahren werden. Alle anderen Verteilungsmodi des Meßobjektes erfordern den Einsatz komplizierter Bildanalyseverfahren (Ploem et al. 1979). Da im vorliegenden Falle ein bandförmiger Farbstoffniederschlag in der Bürstensaumregion des Resorptionsepithels entlang der längsgeschnittenen Zotten das Meßobjekt darstellte, konnte das erstere, einfachere Meßverfahren gewählt werden. Zytophotometrische Quantifizierungsverfahren von Enzymaktivitäten in parenchymatösen Organen, wie z.B. der Leber, zeigen nicht diese günstigen Verteilungseigenschaften des Meßobjektes. Nach Definition der Aktivitätsprofile entlang der Zotten (Gutschmidt et al. 1980), war es sodann möglich, sich auf "plug"(4x4/mm)-Messungen an sogenannten repräsentativen Orten entlang der Zotte (z.B. innerhalb des basalen = "basaler" und am Übergang des mittleren und zum apikalen Zotten-drittel = "apikaler" Meßort) zu beschränken, ein Vorgehen, welches aus Gründen der Meßökonomie insbesondere bei der Analyse größerer Meßkollektive (z.B. verschiedener Darmorte, Schnittdickenkonzentrationen, Tiere etc.) unerlässlich ist: Das komplette halbautomatische "Scannen" einer Seite einer normalen Zotte erfordert nämlich ca. 2 Stunden (Gutschmidt et

al. 1980). Ersetzt man die "plug"-Messungen an den repräsentativen Orten durch "Querprofilmessungen", ein Verfahren, welches bezüglich des zeitlichen Aufwandes zwischen dem "Scannen" und der einfachen "Pfahlmessung" steht, so ergibt sich nach unseren Ergebnissen für die alkalische Phosphatasenreaktion kein wesentlicher Gewinn.

Die Prüfung des Lambert-Beer-Gesetzes direkt am Schnitt, d.h. ohne den Einsatz von halbhistochemischen Modellen, wie z.B. an Polyacrylamidgelfilmen mit inkorporiertem Reaktionsprodukt von van der Ploeg und van Duijn (1968) und Lojda et al. (1967) durchgeführt, erfordert zuerst die spektrophotometrische Charakterisierung des farbigen Reaktionsproduktes "in situ". Wie zu erwarten, ergab sich für die alkalische Phosphatase ein Extinktionsmaximum im Wellenlängenbereich der übrigen Azofarbstoffe, welche mit Fast Blue B oder verwandten Substanzen als Kuppler entstehen (Gossrau 1976b). Nach Registrierung der Spektren an Orten verschieden starker Farbstoffakkumulation ließ sich durch Überprüfung der Gleichgeformtheit dieser Spektren indirekt die Abhängigkeit der Extinktionen von der Konzentration des Meßobjektes (Teil II Lambert-Beer-Gesetz, Eving und Maschka 1964) belegen (Yamaha et al. 1980). Die dabei zu fordernde proportionale Relation beider Größen ist meist nur innerhalb eines bestimmten Bereiches des Extinktionsspektrums gegeben, der später bei der "in situ"-Quantifizierung nicht mehr verlassen werden darf. Die proportionale Abhängigkeit der Extinktion vom Lichtweg (Teil I Lambert-Beer-Gesetz) ließ sich durch definierte Variation der Schnittdicke überprüfen. Schnitte oberhalb $10/\mu\text{m}$ Dicke erwiesen sich als ungeeignet, da bei dickeren Schnitten keine lineare Extinktionszunahme mehr vorlag. Somit ergab sich eine weitere Grenzbedingung, welche bei der Schnittherstellung zu beachten war.

Für die Validisierung der kinetischen "in situ"-Charakterisierung der alkalischen Phosphatase waren die Bedingungen zu prüfen, welche kürzlich von Stoward (1980) zusammengefaßt worden

sind. Unsere Ergebnisse hinsichtlich Lokalisation des farbigen Reaktionsproduktes (Bürstensaumregion, wie aus den vorliegenden Ergebnissen biochemisch präparativer Untersuchungen zu fordern und bereits von Burstone (1962) etabliert), das Fehlen wesentlicher Diffusionsprobleme für den Access von Substrat und Hilfsreagenzien zum Wirkort des Enzymes (kenntlich an den signifikant linearen Regressionen mit Schnittpunkten durch den Ursprung für die Schnittdicken und Zeitabhängigkeit der Akkumulation des farbigen Reaktionsproduktes in der Bürstensaumregion), Überprüfung der Spezifität des Substrates für die enzymhistochemische Reaktion in herkömmlichen biochemischen Vergleichssystemen (Testung unseres histochemischen Substrates in Mucosahomogenaten unter sonst vergleichbaren Bedingungen wie am Schnitt mit Errechnung und Vergleich der apparenten kinetischen Konstanten) sowie Nachweis der Anwendbarkeit von Michaelis-Menten-Kinetiken auf unsere experimentellen Daten durch Vergleich zwischen experimentellen und idealen Sättigungskinetiken zeigen, daß diese Kriterien im wesentlichen erfüllt sind. Ob unter bestimmten Voraussetzungen Endpunktmessungen - wie hier bei der Prüfung der Abhängigkeit der Farbstoffakkumulation von der Substratkonzentration durchgeführt - die gleiche Wertigkeit für die Berechnung "initialer Reaktionsgeschwindigkeiten" besitzen wie eine über die Zeit kontinuierliche Messung des Reaktionsproduktes wird für den Gewebeschnitt kontrovers diskutiert (Stoward 1980). Eine kürzlich für den Azofarbstoffnachweis der Diaminopeptidase IV durchgeführte Untersuchung, welche für die optische Quantifizierung und Charakterisierung "in situ" einen methodisch gleichartigen Weg anwendet, wie er hier für die alkalische Phosphatase beschrieben worden ist, kommt mit beiden Verfahren (Endpunkt und kontinuierliche Messung) zu vergleichbaren apparenten kinetischen Konstanten (Gutschmidt und Gossrau 1981). Daher glauben wir, auch in dieser Studie "in situ" am Schnitt mit hinreichender Genauigkeit apparente kinetische Konstanten errechnen zu können.

5. Zusammenfassung

Die alkalische Phosphatase ist ein wesentliches Enzym der intestinalen Bürstensaummembran, welches auch in anderen Geweben vorkommt und dessen Funktion noch unklar ist. Im Rahmen von Analysen zur Interrelation von Struktur und Funktion an der Dünndarmmukosa entstand das Anliegen, neben anderen Enzymen des Resorptionsepithels auch die alkalische Phosphatase "in situ", d.h. direkt im Gewebeschnitt kinetisch zu charakterisieren und zu quantifizieren. In diesem Zusammenhang wurde darüber hinaus eine Methode benötigt, die es ermöglichte, den Proteingehalt der Bürstensaumregion ebenfalls bei erhaltener histologischer Textur zu quantifizieren und die somit einerseits die Bezugsgröße für die "in situ"-Enzymaktivitäten und andererseits als davon unabhängiger Meß- und Funktionsparameter dienen konnte. Mit diesen beiden Problemstellungen befassten sich die ersten beiden Abschnitte der vorliegenden Arbeit und stellen ein mikrodensitometrisches Verfahren dar, welches sowohl für die auf die Enzymanalyse als auch für die Proteinquantifizierung verwendbar ist. Die gemeinsame Wegstrecke beider Methoden ist zunächst die spektrophotometrische Charakterisierung der jeweiligen farbigen Reaktionsprodukte am Schnitt mit direktem und indirektem Nachweis der Anwendbarkeit des Lambert-Beer-Gesetzes.

Für den Nachweis der alkalischen Phosphatase wird dabei von der Azofarbstoffmethode nach Burstone für die Proteinquantifizierung von den Nachweisreaktionen mit Naphthol-Yellow-S, Dinitrofluorobenzol und Coomassie Brilliant Blue G-250 ausgegangen. Die Äquimolarität der farbigen Proteinnachweise und ihre optisch adäquate Quantifizierbarkeit ist bereits früher von anderen Autoren in Modellsystemen - nicht jedoch am Gewebeschnitt von Darmschleimhaut - gezeigt worden. Innerhalb der im vorliegenden Falle bestehenden Gewebematrix des intestinalen Resorptionsepithels erweist sich nach Anwendung der Prüfkriterien Naphthol-Yellow-S am Schnitt als das geeignetste

Färbeverfahren. Durch Nutzung besonderer Meßtechniken können auch Proteingehaltsprofile der Resorptionsepithelzellen - ermittelt quer zur Zottenlängsachse - beschrieben werden. Um eine kinetische "in situ"-Charakterisierung der alkalischen Phosphatase mit Beschreibung apparenter kinetischer Konstanten zu ermöglichen, sind neben den für die optischen Eigenschaften des Farbstoffniederschlages zu erfüllenden Voraussetzungen weitere Prüfkriterien erforderlich: Lineare Akkumulation des Reaktionsproduktes mit der Schnittdicke und mit der Zeit sowie Vergleich der kinetischen Charakteristika der Nachweisreaktionen "in situ" am Schnitt und im Homogenat. Durch Aufzeigen der Grenzbedingungen für diese einzelnen Punkte läßt sich für die alkalische Phosphatase zeigen, daß bis 10/ μ m Schnittdicke und bis 5 Minuten Inkubationszeit von steady-state-Bedingungen ohne Diffusionsprobleme der Substrate und Hilfsreagenzien zum Enzymort ausgegangen werden kann. Unter diesen Voraussetzungen lassen sich apparente K_m - und V_{max} -Werte entlang der Zotte, d.h. während der endgültigen Ausreifung der Enterozyten, in der Bürstensaumregion beschreiben, welche einen von basal nach apikal ansteigenden Aktivitätsgradienten (Zunahme der V_{max}) bei unveränderter Substrataffinität (gleichbleibende apparente K_m) dokumentieren. Diese Aktivitätszunahme ist - wie für die übrigen Bürstensaumenzyme - überwiegend auf eine Zunahme an Enzymmolekülen, d.h. Proteingehalt, zurückzuführen. Dies zeigen im dritten Teil der vorliegenden Arbeit vergleichende quantitative zytophotometrische Analysen von Proteingehalt (dargestellt mit Naphthol-Yellow-S) und Bürstensaumenzymaktivitäten und zwar sowohl für die alkalische Phosphatase, auf die die hier dargestellte Methode zum erstenmal Anwendung findet, als auch für die bereits vorliegenden quantitativen Verfahren für die α/β -Glukosidase und die DPP IV. Mögliche Bedeutungen für die klinische Biopsiediagnostik und methodenkritische Aspekte werden diskutiert.

6. Literatur

1. Alpers DH. The relation of size to the relative rates of degradation of intestinal brush border proteins. J Clin Invest 51, 2621-2630 (1972)
2. Arfors KE, Beckman L, Lundin LG. Genetic variations of human serum phosphatases. Acta Genet (Basel) 13, 89-94 (1963)
3. Atkins GL, Nimmo IA, Bauermeister A. An evaluation of three methods for fitting Michaelis-Menten-equation to sets of data with common Michaelis-constant but different maximum velocities. Biochem Soc Trans 6, 209-211 (1978)
4. Atkins GL, Nimmo IA. Current trends in the estimation of Michaelis-Menten parameters. Analytic Biochem 104, 1-9 (1980)
5. Bell L, Williams L. Histochemical demonstration of alkaline phosphatase in human large intestine, normal and diseased. Histochemistry 60, 85-89 (1979)
6. Bloch R, Menge H, Lingelbach B, Lorenz-Meyer H, Haberich FJ, Riecken EO. The relationship between structure and function of small intestine in patients with a sprue syndrome and in healthy controls. Klin Wochenschr 51, 1151 (1973)
7. Boyle JT, Celano P, Koldovsky O. Demonstration of a difference in expression of maximal lactase and sucrase activity along the villus in the adult rat jejunum. Gastroenterology 79, 503-507 (1980)

8. Brocklehurst D, Wilde CE. Amniotic fluid alkaline phosphatase, gamma-glytamyltransferase, and 5'nucleotidase activity from 13 to 40 week's gestation, and alkaline phosphatase as an index of fetal lung maturity. *Clinical Chemistry* 26, 588-591 (1980)
9. Brown AJL. Microvilli of the human jejunal epithelial cell. *J Cell Biol* 12, 623-627 (1962)
10. Burlina A, Bugiardini R. Alkaline phosphatase isoenzymes in liver cirrhosis. *Enzyme* 23, 121-126 (1978)
11. Burstone MS. Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. Academic Press, New York - London (1962)
12. Chan SDH, Atkins D. Distribution and properties of Ca^{2+} -ATPase, phytase, and alkaline phosphatase in isolated enterocytes from normal and vitamin D-deficient rats. *GUT* 24, 886-892 (1983)
13. Clarke RM. Mucosal architecture and epithelial cell production rate in the small intestine of the albino rat. *J Anat* 107, 519-529 (1970)
14. Cleland WW. The statistical analysis of enzyme kinetic data. *Adv Enzymol* 29, 1-32 (1967)
15. Davis NT, Flett AA. The similarity between alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) and phytase (EC 3.1.3.8.) activities in rat intestine and their importance in phytase-induced zinc deficiency. *Br J Nutr* 39, 307-316 (1978)

16. Deitch AD. Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye, Naphthol Yellow S, by tissue sections and by purified proteins. *Lab Invest* 4, 324-351 (1955)
17. Dolbeare F, Vanderlaan M, Phares W. Alkaline phosphatase and acid arylamidase as marker enzymes for normal and transformed WI-38 cells. *J Histochem Cytochem* 28, 419-426 (1980)
18. Dowling RH, Riecken EO (eds.). *Intestinal adaptation*. Schattauer, Stuttgart - New York (1974)
19. Eisenthal R, Cornish-Bowden A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem J* 139, 715-720 (1974)
20. Ewing GW, Maschka. *Physikalische Analysen und Untersuchungsmethoden der Chemie*. Dipl.-Ing. Rudolf Bohmann Industrie- und Fachverlag, Wien - Heidelberg (1964)
21. Fernley HN. Mammalian alkaline phosphatase. In: Boyer PD (edit.) *The Enzymes*, Vol IV, Academic Press, New York - London, pp 417-447 (1971)
22. Fric P, Lojda Z. Enzymes of the human jejunal mucosa. *Acta Gastroent. Belg.* 27, 526-530 (1964)
23. Gangl A, Pavelka M, Stöckinger L, Grabner G. Fettresorption: Aktuelle Konzepte und Mikromorphologie. *Z. Gastroenterol* 14, 626-637 (1976)
24. Gossrau R. Histochemische und biochemische Untersuchung der Alpha-Glucosidasen mit 2-Naphtyl-Alpha-D-Glucosid. *Histochemistry* 49, 193-211 (1976)

25. Gossrau R. Localization of glucosidases with naphthyl-substrates. *Histochem J* 8, 271-282 (1976)
26. Gutschmidt S, Kaul W, Riecken EO. A quantitative histochemical technique for the characterization of alpha-glucosidases in the brush-border membrane of rat jejunum. *Histochemistry* 63, 81-101 (1979)
27. Gutschmidt S. Untersuchungen zur mikrodensitometrischen Charakterisierung von Bürstensaumdisaccheridasen "in situ". Methodik und Ergebnisse am Beispiel von vier Alpha- und Beta-Glucosidase-Nachweisen. *Acta histochem Suppl Band XXI*, 97-104 (1980)
28. Gutschmidt S, Emde C, Riecken EO. Quantification of alpha-glucosidases along the villus of the small intestine in man. Introduction of computerized histochemical method. *Histochemistry* 67, 85-97 (1980)
29. Gutschmidt S, Lange U, Riecken EO. Kinetic characterization of unspecific alkaline phosphatase at different villus sites of rat jejunum. A quantitative histochemical study. *Histochemistry* 69, 189-202 (1980)
30. Gutschmidt S. "In situ" determinations of apparent k_m and V_{max} of brush border disaccheridasen along the villi of normal human jejunal biopsy specimens. A quantitative histochemical study. *Histochemistry* 71, 451-462 (1981)
31. Gutschmidt S, Gossrau R. A quantitative histochemical study of Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV). *Histochemistry* 73, 285-304 (1981)

32. Gutschmidt S, Lange U, Riecken EO. "In situ"-measurements of protein contents in the brush border region along rat jejunal villi and their correlations with four enzyme activities. *Histochemistry* 72, 467-479 (1981)
33. Gutschmidt S, Emde C. Early changes in brush border disaccheridase kinetics in rat jejunum following subcutaneous administration of tetraiodothyronine. A quantitative histochemical study on villi revealing normal morphology. *Histochemistry* 73, 151-161 (1981)
34. Gutschmidt S, Menge H, Riecken EO. Kinetic properties of neutral-alpha-glucosidase in the atrophic mucosa of self-emptying blind loops of rat jejunum. A micro-densitometric study at two different villus sites. *Lab Invest* 46, 476-480 (1982)
35. Gutschmidt S, Sandforth F, Menge H, Riecken EO. Adaptative response of alpha- and beta-glucosidase kinetics along the villi of rat self-filling jejunal blind loops. *GUT* 23, 376-381 (1982)
36. Gutschmidt S, Menge H, Riecken EO. "In situ" kinetic data of brush border disaccheridases at different villus sites during intestinal adaptation. In: Robinson JW, Dowling RH, Riecken EO (eds.). *Mechanisms of intestinal adaptation*. MTP Press, Lancaster - Boston - The Hague, pp 371-382 (1982)
37. Gutschmidt S. Dünndarmenzymdiagnostik. In: *Handbuch der inneren Medizin*. Band 3 A (Verdauungsorgane, WF. Caspary edit.). S. 748-777, Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1983)

38. Gutschmidt S, Hopert R, Gossrau R. Kinetic characterisation of brush border membrane proteases in relationship to mucosal architecture by section biochemistry. In: Proteases, potential role in health and disease (Heidland A, Hörl WH, eds.). Plenum Publishing Company, London, (1983)
39. Gutschmidt S, Kaul W, Menge H, Riecken EO. The adaptive response of disaccharidase activities at different sites along the villous epithelium after proximal intestinal resection in the rat. A microdensitometric study of enzyme kinetics. Res Exp Med 182, 203-2013 (1983)
40. Gutschmidt S, Gartemann H. Effect of solitary biliary diversion to the ileum on function and morphology of duodenal and ileal mucosa in the rat. J Paediatric Gastroenterol Nutr 2, 677-682 (1983)
41. Hopert R, Gutschmidt S. Untersuchungen zur Regulation von Bürstensaumenzymen entlang des Dünndarms. Z. Gastroenterol 20, 507 (Abstract) (1982)
42. Hopsu VK, McMillan PJ. Quantitative characterization of histochemical enzyme system. J Histochem Cytochem 12, 315-324 (1964)
43. Humphreys MH, Chou LY. Anion-stimulated ATPase activity of brush border from rat small intestine. Am J Physiol 236, E70-E76 (1979)
44. Kaplan MM. Progress in Hepatology. Alkaline Phosphatase. Gastroenterology 62, 452-468 (1972)
45. Kaplow LS. Leucocyte alkaline phosphatase cytochemistry applications and methods. Ann NY Acad Sci 155, 911 (1968)

45. Kaysen GA, Chou LY, Humphreys MH. Requirement of Zn to demonstrate HCO_3 -stimulated ATPase activity of rat small intestinal brush border. J Cell Biol 82, 780-782 (1979)
47. Lane SM, Lawsen DEM. Differentiation of the changes in alkaline phosphatase from calcium ion-activated adenosine triphosphatase activities associated with increased calcium absorption in chick intestine. Biochem J 174, 1067-1070 (1978)
48. Lojda Z, Ploeg Mvd, Duijn Pv. Phosphates of the naphthol-AS-series in the quantitative determination of alkaline and acid phosphatase activities "in situ" studied in polyacrylamide membrane model systems and by cytospectrophotometry. Histochemie 11, 13-32 (1967)
49. Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH. Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1979)
50. McComb RB, Bowers GN, Posen S. Alkaline phosphatase. Plenum Publishing Comp, New York (1979)
51. McKenna MJ, Hamilton ThA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. Biochem J 181, 67-73 (1979)
52. Madara JL, Trier JS, Neutra MR. Structural changes in the plasma membrane accompanying differentiation of epithelial cells in human and monkey small intestine. Gastroenterology 78, 963-975 (1980)
53. Malik N, Butterworth PJ. Molecular properties of rat intestinal alkaline phosphatase. Biochem Biophys Acta 446, 105-114 (1976)

54. Marche P, Cassier P, Meithieu H. Intestinal calcium binding protein. A protein indicator of enterocyte maturation associated with the terminal web. *Cell Tissue Res* 212, 63-72 (1980)
55. Mayall BH, Mendelsohn ML. Errors in absorption cyto-histochemistry: Some theoretical and practical considerations. In: *Introduction to quantitative cytochemistry*. Wied GL, Bahr BF (eds.), Vol II, pp 171-194, Academic Press New York (1970)
56. Menge H, Robinson JW, Riecken EO. Anpassungsmöglichkeiten der Dünndarmschleimhaut an verschiedene intraluminale Milieuveränderungen. *Z Gastroenterol* 14, 420-433 (1976)
57. Menge H, Riecken EO. Dünndarmfunktionsdiagnostik. *Z Gastroenterol* 16, 198-205 (1978)
58. Menge H, Robinson JW. The relationship between the functional and structural alterations in the rat small intestine following proximal resection of varying extents. *Res Exp Med* 173, 41-53 (1978)
59. Menge H, Köhn R, Dietermann KH, Lorenz-Meyer H, Riecken EO, Robinson JW. Structural and functional alterations in the mucosa of self-filling intestinal blind loops in rats. *Clin Sci* 56, 121-131 (1979)
60. Menge H, Sepulveda FV, Smith MW. Cellular adaptation of amino acid transport following intestinal resection in the rat. *J Physiol* 334, 213-223 (1983)

61. Moog F, Grey RD. Alkaline phosphatase isoenzymes in the duodenum of the mouse: Attainment of a pattern of spatial distribution in the normal development and under the influence of cortisone or actinomycin D. *Dev Biol* 18, 481-500 (1968)
62. Morita A, Tsao D, Kim YS. Effect of sodium butyrate on alkaline phosphatase in HRT-18, a human rectal cancer cell line. *Cancer Res* 42, 4540-4545 (1982)
63. Nakasaki H, Matsushima T, Sato S, Kawachi T. Purification and properties of alkaline phosphatase from the mucosa of rat small intestine. *J Biochem* 86, 1225-1231 (1979)
64. Nordström C, Dahlquist A, Josefsson L. Quantitative determination of enzymes in different parts of the villi and crypts of the rat small intestine. Comparison of alkaline phosphatase, disaccharidases and dipeptidases. *J Histochem Cytochem* 15, 713-721 (1968)
65. Nordström C, Dahlquist A. Quantitative distribution of some enzymes along the villi and crypts of human small intestine. *Scand J Gastroenterol* 8, 407-416 (1973)
66. Norman AW, Mircheff AK, Adams TH, Spielvogel A. Studies on the mechanism of action of calciferol. III. Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. *BBA* 215, 348-359 (1970)
67. Nusbickel FR. A technique for quantitating enzyme histochemistry in adjuvant arthritic joints. I. Alkaline phosphatase. *Histochem J* 11, 573-585 (1979)

68. Pflleiderer G, Baier M, Mondorf AW, Stefanescu T, Scherberich JE, Müller H. Change in alkaline phosphatase isoenzyme pattern in urine as a possible marker for the renal disease. *Kidney Int* 17, 242-249 (1980)
69. Ploeg Mvd, Duijn Pv. Cytophotometric determination of alkaline phosphatase activity of individual neutrophilic leucocytes with a biochemically calibrated model system. *J Histochem Cytochem* 16, 693-706 (1968)
70. Ploem JS, Verwoerd N, Bonnet J, Koper G. An automated microscope for quantitative cytology combining television image analysis and stage scanning microphotometry. *J Histochem Cytochem* 27, 136-143 (1979)
71. Riecken EO, Martini GA. Die Klassifizierung pathologischer Dünndarmschleimbautbilder. *DMW* 98, 998-1004 (1973)
72. Riecken EO, Sahlfeld M, Lorenz-Meyer H. Quantitative Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur der Dünndarmschleimbautveränderungen bei Gesunden und Patienten mit einheimischer Sprue. *Dtsch Med Wochenschr* 101, 51 (1976)
73. Robinson JWL. Adaptationsformen der Dünndarmschleimbaut. In: *Handbuch der inneren Medizin*. Band 3A (Verdauungsorgane, WF Caspary edit). S. 542-566, Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1983)
74. Rodewald R. Distribution of immunoglobulin G-receptors in the small intestine of the young rat. *J cell Biol* 85, 18-32 (1980)
75. Sachs L. *Angewandte Statistik*, 4. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1974)

76. Saini PK, Done J. The diversity of alkaline phosphatase from rat intestine. Isolation and purification of the enzyme(s). *Biochem Biophys Acta* 258, 147-153 (1972)
77. Sandritter W. Methods and results in quantitative cytochemistry. In: Introduction to quantitative cytochemistry. Wied GL (edit.), pp 159-182. Academic Press, New York (1966)
78. Schlaeager R, Haux P, Kattermann R. Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholostasis: Significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of alkaline phosphatase from rat liver. *Enzyme* 28, 3-13 (1982)
79. Seargeant LE, Stinson RA. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature (Lond)* 281, 152-154 (1979)
80. Sedmark JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G 250. *Anal Biochem* 79, 544-552 (1977)
81. Seetharam B, Yeh KY, Moog F, Alpers DH. Development of intestinal brush border membrane protein in the rat. *Biochem Biophys Acta* 470, 424-436 (1977)
82. Simon PM, Keding M, Raul f, Grenier JF, Haffen K. Developmental pattern of rat intestinal brush border enzymatic proteins along the villus-crypt axis. *Biochem J* 178, 407-413 (1979)
83. Stiel D, Murray DJ, Peters TJ. Mucosal enzyme activities with special reference to enzymes implicated in bicarbonate secretion, in the duodenum of rats with cysteamine-induced ulcers. *Clin Science* 64, 341-347 (1983)

84. Stoward P. Criteria for the validation of quantitative histochemical enzyme techniques. In: Trends in enzyme histochemistry and cytochemistry (Ciba Foundation Symposium 73), Excerpta Medica Amsterdam - Oxford - New York, pp 11-31 (1980)
85. TAS J, James J, Ploeg Mvd. Adaptation of the Naphthol Yellow S staining for objects with high protein content. Histochemistry 55, 185-195 (1978)
86. TAS J, Ploeg Mvd, Mitchell JP, Cohn NS. Protein staining methods in quantitative cytochemistry. J Microsc 119, 295-311 (1980)
87. Wachsmuth ED, Tohorst A. Possible precursors of aminopeptidase and alkaline phosphatase in the proximal tubules of kidney and the crypts of small intestine of mice. Histochemistry 38, 43-56 (1974)
88. Wachsmuth ED. Quantification of nephrotoxicity in rabbits by automated morphometry of alkaline phosphatase stained kidney sections. Histochemistry 71, 235-248 (1981)
89. Weijers RNM. Properties and clinical significance of an alkaline phosphatase-lipoprotein-x complex. Clin Chemistry 26, 609-612 (1980)
90. Wilkinson GN. Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochem J 80, 324-332 (1961)
91. Williams DM, Gillett R, Linder JE. Light microscope and electron microscope alkaline phosphatase cytochemistry of rat bone marrow leukocytes. J Histochem Cytochem 27, 665-675 (1979)

92. Yamaha MO, Chikamori K, Tewari N, Wegmann R. Cytospectral quantification for cellular dehydrogenases. *Cell Mol Biol* 26, 347-352 (1980)
93. Zanker V. Grundlagen der Farbstoff-Substrat-Beziehungen in der Histochemie. *Acta histochem Suppl XXIV*, 151-168 (1981)
94. Zerlotti E, Engel MB. The reactivity of proteins of some connective tissues and epithelial structures with 2,4-Dinitrofluorobenzene. *J Histochem Cytochem* 10, 537-546 (1962)

Lebenslauf

Am 6.7.1950 als Sohn des Kaufmanns Alfred Lange und der Hausfrau Gerda Lange geb. Kammholz in Berlin-Steglitz geboren.

1957 - 1963 Rothenburg-Grundschule in Berlin-Steglitz

1963 - 1970 Hermann-Ehlers-Gymnasium in Berlin-Steglitz

1.4.1970-28.8.1970 Technisches Praktikum bei Siemens in Berlin

1971 - 1972 Wirtschaftsingenieurstudium an der TU-Berlin

1972 - 1976 Soziologiestudium in Berlin, Münster und Paris

1977 Diplomprüfung in Soziologie

16.9.1976 Beginn des Humanmedizinstudiums an der FU Berlin

9.5.1983 Ärztliche Prüfung

18.5.1983 Approbation

1.7.1983 Anstellung als Arzt im Sozialpsychiatrischen Dienst Berlin-Spandau

1.1.1985 Anstellung als Assistenzarzt in der Nervenlinik Spandau

